

Charakterisierung des *Arabidopsis thaliana* Aquaporins AtNIP1;1

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl.-Ing. agr. Kerstin Fileschi

aus

Braunschweig

Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stefan Scheu

Tag der Einreichung: 25.03.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2008

Darmstadt 2008

D17

Ich danke ganz herzlich...

...Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff für die Bereitstellung des Themas, sein Vertrauen, seine Hilfe und Unterstützung während der Arbeit sowie seine konstruktive Kritik.

...Prof. Dr. Stefan Scheu dafür, dass er sich als Gutachter für meine Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

...Dr. Adam Bertl, für seine Unterstützung bei den „Stopped-Flow“-Experimenten.

...allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kaldenhoff, die mir mit Rat und Tat beigestanden haben.

...allen Korrekturlesern.

...meinen Freunden, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

...meiner Familie, ganz besonders meiner Mutter.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Pflanzlicher Stickstoffhaushalt	1
1.2 Pflanzliche Aquaporine	2
1.2.1 Nodulin26-ähnliche intrinsische Proteine	4
1.3 Ziele der Arbeit.....	7
2. Ergebnisse.....	8
2.1 Untersuchungen zur Wasser- und Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1 mittels „Stopped-Flow“-Spektrophotometrie	8
2.1.1 Untersuchung der Wasserleitfähigkeit.....	8
2.1.1.1 Bestimmung der optimalen Induktionsdauer der Expression von AtNIP1;1 im heterologen Hefe-Expressionssystem.....	9
2.1.1.2 Bestimmung der Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1	11
2.1.1.3 Untersuchungen zur Quecksilbersensitivität der Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1	12
2.1.1.4 Untersuchungen zur Temperatur-Abhängigkeit der Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1	14
2.1.2 Untersuchung der Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1	14
2.1.2.1 Untersuchungen zur Quecksilbersensitivität der Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1	15
2.1.2.2 Untersuchungen zur Temperatur-Abhängigkeit der Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1	16
2.1.2.3 AtNIP1;1: Leitfähig für Ammonium oder Ammoniak?.....	17
2.2 Untersuchungen zur Expression von AtNIP1;1 in Arabidopsis thaliana.....	18
2.2.1 Auswertung von Microarray-Daten.....	18
2.2.1.1 Untersuchung der Expression von AtNIP1;1 in Arabidopsis thaliana	19
2.2.1.2 Untersuchung der Expression von AtNIP1;1 in Abhängigkeit verschiedener Stressfaktoren	20
2.2.2 GUS-Test zur Lokalisation der Genexpression	23
2.2.2.1 Lokalisation der AtNIP1;1-Promotor-Aktivität.....	23
2.3 Zelluläre Lokalisation von AtNIP1;1 mittels mGFP4	25
2.3.1 Untersuchung der zellulären Lokalisation von AtNIP1;1	25

2.4	Charakterisierung von AtNIP1;1-T-DNA-Insertionsmutanten	25
2.4.1	Nachweis der Insertionsstelle der T-DNA in den Linien N516617 und N517916.....	26
2.4.2	Nachweis der Anzahl der T-DNA-Insertionen in den Linien N516617 und N517916.....	28
3.	Diskussion.....	30
3.1	Untersuchung der Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1	30
3.2	Untersuchung der Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1	30
3.3	Zwei Substrate – zwei Transportwege?	31
3.4	Expression und Lokalisation von AtNIP1;1	33
3.5	Physiologische Funktionen von AtNIP1;1 in der Pflanze.....	34
3.5.1	Mögliche Funktion aufgrund der Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1	34
3.5.2	Mögliche Funktion aufgrund der Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1 ...	34
3.6	Ausblick	36
4.	Material und Methoden.....	38
4.1	Kultivierung der Pflanzen und Probennahme	38
4.1.1	Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
4.1.2	Probennahme an <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
4.2	Vorgehensweise mit Bakterien	39
4.2.1	Verfahren mit <i>Escherichia coli</i>	39
4.2.2	Herstellen kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	40
4.2.3	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	40
4.2.4	Verfahren mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
4.2.5	Herstellen kompetenter <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	41
4.2.6	Hitzeschock-Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	42
4.3	Verfahren mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
4.3.1	Verwendeter Stamm/Kultivierung	42
4.3.2	Herstellen einer <i>S. cerevisiae</i> -Dauerkultur	44

4.3.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	44
4.3.3.1	Biolistische Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	44
4.3.3.2	Herstellung kompetenter Hefezellen mit Lithiumacetat	44
4.3.3.3	Transformation von Hefezellen mittels Lithiumacetat-Methode	45
4.3.4	Isolation der Plasmid-DNA aus Hefezellen.....	45
4.3.5	Induktion der Protein-Expression transformierter Hefen.....	46
4.3.6	Protoplastierung von Hefezellen.....	46
4.3.7	Beladen von Hefezellen mit Fluorescein-Bisacetat.....	47
4.3.8	Quecksilberinkubation von Hefezellen	48
4.4	Verfahren mit DNA.....	48
4.4.1	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels Plasmid-Mini-Präparation ..	48
4.4.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>A. tumefaciens</i> mittels Plasmid-Mini- Präparation.....	49
4.4.3	Isolation genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	49
4.4.4	Isolation genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i> (nach Dolferus, 1991)	50
4.4.5	Restriktionsabbau von DNA.....	51
4.4.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel	51
4.4.7	Elution von DNA aus einem Agarosegel.....	52
4.4.8	Sequenzieren von DNA-Fragmenten	52
4.4.9	Bedingungen für die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	52
4.4.10	TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR)	53
4.4.11	T/A-Klonierung von PCR-Fragmenten	56
4.4.12	Ligation von cDNA-Fragmenten in binäre Vektoren	57
4.4.13	Herstellen einer DIG-UTP-markierten cDNA-Sonde	57
4.4.14	Behandlung der Agarose-Gele für Southern Blots	58
4.4.15	Transfer der DNA auf eine Nitrozellulose-Membran (Southern Blot)	58
4.4.16	Hybridisierung von Southern Blots mit DIG-markierter Sonde	59
4.4.17	Antikörper-Nachweis und Detektion.....	59

4.5	„Stopped-Flow“-Spektrophotometrie.....	61
4.5.1	Untersuchung der Wasserpermeabilität von Hefenprotoplasten mittels „Stopped-Flow“-Spektrophotometrie.....	62
4.5.2	Berechnung des Wasserpermeabilitätskoeffizienten von Hefeprotoplasten.....	62
4.5.3	Untersuchung der Ammoniakpermeabilität von Hefezellen mittels „Stopped-Flow“-Spektrophotometrie.....	63
4.5.4	Berechnung der Aktivierungsenergie für den Wasser-, bzw. Ammoniaktransport über die Hefemembran.....	63
4.6	Auswertung von Microarray-Daten (Genevestigator)	64
4.6.1	Untersuchung der Expression von AtNIP1;1 in Abhängigkeit von Salz- und osmotischem Stress.....	64
4.6.2	Untersuchung der Expression von AtNIP1;1 in Abhängigkeit von Nitrat-Mangel.....	65
4.7	Zelluläre Lokalisation von AtNIP1;1 mittels mGFP4	65
4.7.1	Herstellung eines AtNIP1;1-mGFP4-Fusionsproteins	65
4.7.2	Beladen der Wolfram-Partikel	66
4.7.3	Transiente Transformation von Pflanzenteilen.....	66
4.7.3.1	Analyse der transformierten Zellen unter einem CLSM	67
4.8	Lokalisation der AtNIP1;1-Expression	68
4.8.1	Klonierung des AtNIP1;1-Promoters	68
4.8.2	Die Gateway®-Cloning Technologie	68
4.8.3	Fusion des AtNIP1;1-Promotors mit einem GUS-Reportergen	69
4.8.4	GUS-Test zur Lokalisation der Genexpression	69
4.9	Stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> mittels „Floral Dip“	70
4.9.1	Präparation von <i>A. tumefaciens</i> für die Transformation	70
4.9.2	Transformation von <i>A. thaliana</i> mittels „Floral-Dip“	70
4.9.3	Selektion transformierter <i>A. thaliana</i> -Pflanzen.....	71
5.	Zusammenfassung	72

6. Literaturverzeichnis	73
7. Anhang	81
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	81
7.2 Primer	83
7.3 Sequenzen.....	84
7.3.1 AtNIP1;1-Promotorregion	84
7.3.2 Sequenz T-DNA-Insertionslinie N516617	85
7.3.3 Sequenz T-DNA-Insertionslinie N517916.....	85
7.3.4 Sequenz T-DNA-Sonde (Southern Blot)	85
7.4 Ein-, bzw. Dreibuchstabencode der Aminosäuren	86
7.5 Vektorkarten.....	87
7.5.1 pDONR Zeo: Entry Vektor für Gateway-Klonierung (Invitrogen)	87
7.5.2 pMDC164: Vektor für die AtNIP1;1/Promotor-Fusion (Curtis et al., 2003) .	87
7.5.3 pPily: Vektor für die transiente Transformation der AtNIP1;1/mGFP4-Fusion in Zwiebelzellen	88
7.5.4 pYES2/CT: Hefeexpressionsvektor (Invitrogen).....	88
7.5.5 pDRIVE: TA-Klonierungsvektor (QIAGEN)	89

1. Einleitung

1.1 Pflanzlicher Stickstoffhaushalt

Die Verfügbarkeit von Stickstoff ist für das pflanzliche Wachstum einer der wichtigsten limitierenden Faktoren. Stickstoff wird unter anderem als Baustein für Aminosäuren und Nukleinsäuren benötigt und ist somit essentiell für die Bildung von Proteinen und DNA.

Die Atmosphäre besteht zu etwa 80 % aus Stickstoff, dieser ist jedoch für Pflanzen und die meisten anderen lebenden Organismen nicht verwertbar. Allerdings gibt es natürliche und industrielle Prozesse, die den atmosphärischen Stickstoff für Pflanzen verfügbar machen. Den wichtigsten natürlichen Beitrag (90 %) zur Fixierung von Stickstoff leisten einige Bakterien-Arten. Sie sind in der Lage atmosphärischen Stickstoff in Ammoniak umzuwandeln. Ein Beispiel dafür sind Bakterien der Gattung *Rhizobium*, die in Symbiose mit Leguminosen leben und die Pflanze mit dem fixierten Stickstoff versorgen. Dafür erhalten sie von der Leguminose im Wesentlichen Kohlenhydrate.

Pflanzen nehmen Stickstoff hauptsächlich in Form von Nitrat oder Ammonium aus dem Boden auf. Für die Aufnahme und die Regulation der Aufnahme von Ammonium bzw. Nitrat gibt es jeweils so genannte „low“- und „high-affinity“-Transporter-Systeme (Tsay et al., 1993, Marini, et al., 1994, Ninnemann, et al., 1994, Crawford & Glass 1998, Huang et al., 1999, von Wirén & Merrick, 2004). Obwohl es klare Hinweise auf die Existenz von „low-affinity“-Ammoniumtransportern (LATS) gibt (Ludewig, et al., 2003), konnten sie bisher noch nicht molekular identifiziert werden.

In der Regel wird von Pflanzen bevorzugt Nitrat aufgenommen, das in der Pflanze auch in hohen Mengen gespeichert oder transportiert werden kann. Für den Einbau des Stickstoffs in organische Verbindungen wird dieser in seiner maximal reduzierten Form benötigt. Aus diesem Grund wird das aufgenommene Nitrat in zwei Schritten durch eine Nitrat- und eine Nitritreduktase in der Pflanze zu Ammoniak reduziert.

Ammoniak ist in größeren Mengen für Pflanzen toxisch, da es die für die Photosynthese und den respiratorischen Elektronentransport notwendigen transmembranen Protonengradienten stört. Deshalb wird es nach der Aufnahme/Entstehung zügig in Aminosäuren eingebaut. Dies geschieht im Wesentlichen über den GS-GOGAT-Zyklus. Dabei wird zunächst, katalysiert durch

Glutaminsynthetasen, aus Glutamat und Ammoniak Glutamin gebildet. In Pflanzen gibt es zum einen Glutaminsynthetasen, die in den Plastiden und Chloroplasten (GS2) lokalisiert sind und hauptsächlich für die Fixierung des während der Photorespiration freigesetzten Ammoniaks verantwortlich sind und zum anderen zytosolische Glutaminsynthetasen (GS1) die unter anderem in den Leitbündeln der Wurzeln lokalisiert sind (Oaks et al., 1985; Lam, et al., 1996; Tobin et al., 2002). Das dort gebildete Glutamin kann in der Pflanze weiter transportiert werden.

Im nächsten Schritt des GS-GOGAT-Zyklus wird die Amidgruppe aus dem Glutamin durch Glutamatsynthetasen zu 2-Oxoglutarat transferiert, wobei zwei Glutamat-Moleküle entstehen. Nach dem Umbau in Glutamin/Glutamat erfolgt der Einbau des Stickstoffs in andere Aminosäuren über Transaminierung.

An den Transport/Aufnahme-Prozessen im pflanzlichen Stickstoffhaushalt ist eine Vielzahl von Transportern/Kanälen beteiligt. Seitdem eine Ammoniakleitfähigkeit für einige pflanzliche Aquaporine nachgewiesen wurde (Jahn et al., 2004, Holm et al., 2005; Loque et al., 2005; Uehlein et al., 2007; Bertl & Kaldenhoff, 2007), ist eine physiologische Bedeutung von Aquaporinen innerhalb des Stickstoffhaushalts von Pflanzen denkbar. Es wäre in diesem Zusammenhang möglich, dass ammoniakleitfähige Aquaporine, den „low-affinity“-Ammonium-Transporter darstellen.

1.2 Pflanzliche Aquaporine

Aquaporine gehören zu der Superfamilie der Major Intrinsic Proteins (MIP). Sie sind integrale Membranproteine, die den bidirektionalen Transport von Wasser und anderen ungeladenen Molekülen (z.B. CO₂, Ammoniak und Harnstoff) über die Membran erleichtern. Abbildung 1 zeigt die Struktur von Aquaporinen am Beispiel von AtNIP1;1.

Pflanzliche Aquaporine können aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in vier Familien unterteilt werden (Chaumont et al., 2001; Johanson et al., 2001; Johanson & Gustavsson, 2002), die im Folgenden beschrieben werden.

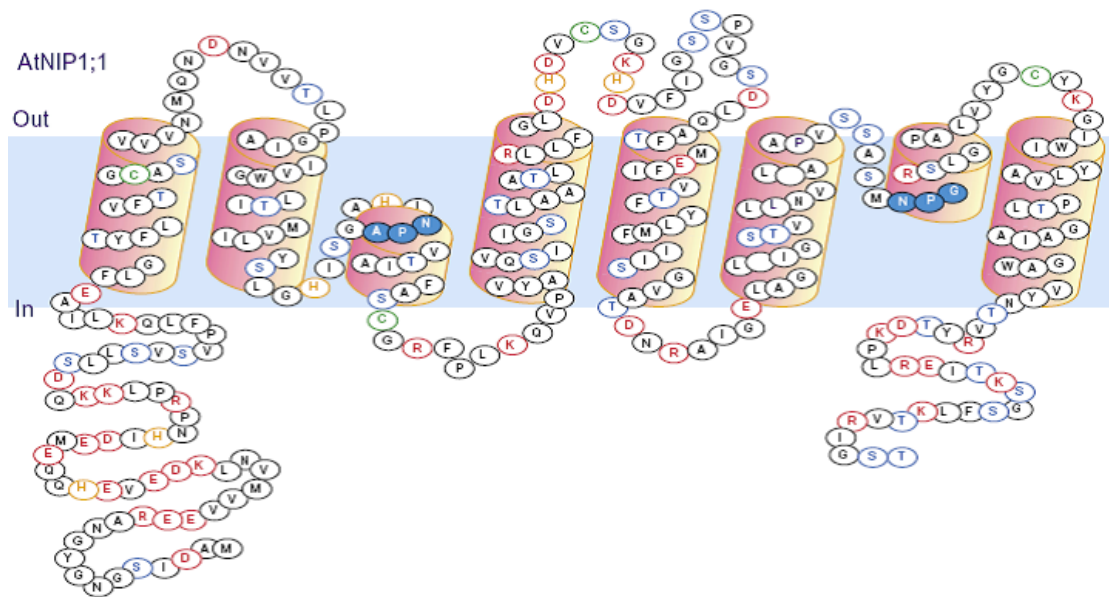


Abbildung 1: Struktur von AtNIP1;1 (aus Quigley et al., 2001). Aquaporine weisen sechs transmembrane Helices auf, die durch drei extra- und zwei intrazelluläre Loops verbunden sind. Die eigentliche Pore wird durch die Loops B und E gebildet, in denen das hochkonservierte NPA-Motiv (hier blau markiert) lokalisiert ist.

1. Plasmamembran-intrinsische Proteine (PIP)

Die Benennung der PIPs erfolgte zunächst aufgrund ihrer Lokalisation in der Plasmamembran von Pflanzenzellen. Mittlerweile konnten PIP-Aquaporine auch in anderen Membranen nachgewiesen werden, z.B. in der inneren Chloroplastenmembran (Uehlein et al., 2008). PIP-Aquaporine können in zwei Untergruppen unterteilt werden, die sich hauptsächlich in ihrer Selektivität unterscheiden. Während PIP2-Aquaporine sich durch eine sehr hohe Wasserleitfähigkeit auszeichnen (Biela et al., 1999; Dean et al., 1999; Gerbeau et al., 1999; Ishikawa et al., 2005; Takano et al., 2006), weisen PIP1-Aquaporine kaum eine Wasserleitfähigkeit, dafür aber eine Leitfähigkeit für andere ungeladene Moleküle auf. So wurde PIP1-Aquaprin NtAQP1 beispielsweise als CO₂-leitfähig charakterisiert (Uehlein et al., 2004).

2. Tonoplast-intrinsische Proteine (TIP)

TIP-Aquaporine sind hauptsächlich in der Vakuolenmembran (Tonoplast) lokalisiert. Mitglieder dieser Familie wurden nicht nur als wasserleitfähig, sondern auch als ammoniakleitfähig charakterisiert (Jahn et al., 2004, Holm et al., 2005; Loque et al. 2005, Bertl & Kaldenhoff, 2007).

3. Kleine und basische intrinsische Proteine (SIP)

Bei den SIPs handelt es sich um die kleinste Gruppe der pflanzlichen Aquaporine. So findet man in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* nur drei SIPs und damit deutlich weniger Mitglieder als in den anderen Aquaporin-Familien. Sie weisen im Vergleich zu anderen Aquaporinen einen verkürzten N-Terminus auf und sind im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Johanson & Gustavsson, 2002; Ishikawa et al., 2005). Für einige SIPs konnte eine Wasserleitfähigkeit gezeigt werden (Ishikawa et al., 2005).

4. Nodulin26-ähnliche Proteine (NIP)

Diese Arbeit befasst sich mit einem Mitglied der NIPs, deshalb wird diese Familie in 1.2.1 detailliert beschrieben.

Auffallend ist die hohe Anzahl verschiedener Aquaporine, die Pflanzen im Vergleich zu tierischen Organismen besitzen. In *Arabidopsis thaliana* wurden 35 Aquaporin-Gene identifiziert (Johanson et al., 2001) während der Mensch lediglich 13 Aquaporine besitzt (Agre et al., 2002). Die deutlich höhere Anzahl lässt sich zum einen dadurch erklären, dass die an einen festen Standort gebundenen Pflanzen präzisere Möglichkeiten zur zeitlichen und örtlichen Regulation des Wasserflusses benötigen. Zum anderen weisen Leitfähigkeiten für andere Moleküle auf Funktionen von Aquaporinen jenseits des Wasserhaushaltes der Pflanze hin.

1.2.1 Nodulin26-ähnliche intrinsische Proteine

Nodulin26-ähnliche intrinsische Proteine wurden nach Nodulin 26 aus der Sojabohne benannt (Weig et al., 1997), das als eines der ersten pflanzlichen Aquaporine entdeckt wurde (Fortin et al., 1987). Es bildet den Hauptbestandteil der Symbiosomen-Membran (ca. 15% der Proteine) in der Symbiose zwischen Rhizobien und Sojabohne (Weaver et al., 1991). Für Nodulin 26 wurde neben einer moderaten Wasserleitfähigkeit (Rivers et al., 1997, Dean et al., 1999), eine Leitfähigkeit für Glycerin nachgewiesen (Dean et al., 1999). Auch für weitere bisher untersuchte NIPs konnte eine Glycerin-Leitfähigkeit in heterologen Systemen gezeigt werden (Cabello-Hurtado & Ramos, 2004; Wallace et al., 2002; Weig et al., 2000b). Die Frage der tatsächlichen physiologischen Bedeutung der Glycerinleitfähigkeit von Aquaporinen in der Pflanze ist bisher ungeklärt.

Von besonderem Interesse sind Hinweise auf eine Ammoniak-Leitfähigkeit von Nodulin 26 (Niemitz & Tyerman, 2000). Da in der Rhizobien-Symbiose hauptsächlich der von den Bakterien fixierte Stickstoff von den Bakterien zur Pflanze transportiert wird, könnte Nodulin 26 in diesem Transfer eine entscheidende Rolle spielen. Kürzlich wurde zudem entdeckt, dass Nodulin 26 in seinem zytosolischen C-terminalen-Bereich eine Aminosäuresequenz zu beinhalten scheint, die eine Interaktionsstelle für eine Glutaminsynthetase aus der Sojabohne bietet (Wallace et al., 2006). Damit wäre die Verbindung zum ersten Schritt des GS-GOGAT-Zyklus und somit zum Einbau des Ammoniaks in Aminosäuren der Pflanze geschaffen.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu bakteriellen Aquaporinen wird vermutet, dass die NIPs ursprünglich durch einen horizontalen Gentransfer aus Bakterien in Pflanzen gelangt sind (Zardoya et al., 2002).

Die Familie der NIPs hat in *Arabidopsis thaliana* neun Mitglieder (Quigley et al., 2001). *A. thaliana* ist eine der wenigen Pflanzen, die ohne jegliche Mykorrhizierung und ohne Symbiose mit Bakterien wächst. Das Vorhandensein einer großen Anzahl unterschiedlicher NIP-Aquaporine in dieser Pflanze zeigt auf, dass sie eine physiologische Rolle außerhalb einer Beteiligung in symbiontischen Beziehungen haben müssen. Dies wird durch neuere Arbeiten bestätigt. So zeigt AtNIP2;1 beispielsweise eine Leitfähigkeit für Milchsäure und könnte somit in pflanzliche Anpassungsprozesse bei der Milchsäureentstehung unter Sauerstoffmangel involviert sein (Choi et al., 2007). AtNIP5;1 ist leitfähig für Borsäure und hat Einfluss auf das Wachstum von Pflanzen unter Bor-Mangel (Takano et al., 2006) und ein zu AtNIP7;1 homologes Aquaporin in Reis leitet Silikonsäure (Ma et al., 2006). Diese Beispiele zeigen die große Variabilität in den Transporteigenschaften und physiologischen Funktionen von Mitgliedern der NIP-Familie.

NIPs können aufgrund von Unterschieden in der ar/R-Region in zwei Unterfamilien unterteilt werden (Wallace et al., 2004). Die ar/R-Region ist neben der hochkonservierten NPA-Region einer der beiden Selektivitätsfilter der Pore (de Groot & Grubmüller, 2001; Sui et al., 2001; de Groot et al., 2003) und hat somit Einfluss auf die Leitfähigkeit eines Aquaporins. Zu der ersten Unterfamilie der NIPs gehören AtNIP1;1, AtNIP1;2, AtNIP2;1, AtNIP3;1 und AtNIP4;1. Diese weisen eine zu Nodulin 26 identische ar/R-Region auf (Abb. 2), wobei besonders AtNIP1;1 und AtNIP1;2 auch eine hohe Ähnlichkeit mit der Gesamt-Sequenz von Nodulin 26 besitzen (Abb. 3).

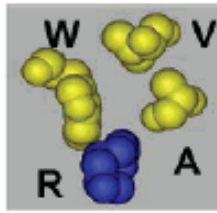


Abbildung 2: Aminosäurezusammensetzung der ar/R-Region von Nodulin 26 und den Mitgliedern der NIP-Unterfamilie I (aus Wallace et al., 2005).

AtNIP1_1	HADISGNGYGNAREEVVHVNLDVEHQEMEDIHNPRLKKQDSSLVSVPFLQKLIAE 60
Nodulin	HADYS-----ARTESCEVVVNVTKDTSKTMEPSDS-----FVSVPFLQKLVAE 43
	*** * ** * * :: : .: ** .. *****:**
AtNIP1_1	FLGTYFLVFTGCASVVVMHQNMDNVVTLPGIAI ^W ELTIMVLIYSLGHISGAH ^V NPA/TIA 120
Nodulin	VVGTYFLIFAGCASVVVMKMNMDNVVTLPGIAI ^W ELVVTVLVYTVGHISGAH ^V NPA/TIA 103
	..*****:*:***** :***** ^W ***.: **:.:***** ^V *****
AtNIP1_1	FASCGRFPLKQVPAYVISQVIGSTLAAATLRLFLGLDHDVCSGKHDVFIGSSPVGSDLQA 180
Nodulin	FASTRRFPLNQVPAYVAAQLLGSTLASGTLKLLF-----MGKHDQFSCTLPNGTNLQA 156
	*** **** ***** :*:*****:.*:*** **** * *: * *:***
AtNIP1_1	FTMEFIVTFYLNHFIISGVATDMRAKLNIGTKCCNIQIGELAGLAIGSTVLL ^V IAAPVS 240
Nodulin	FVFEFIITFLNHFVISGVATDMRA-----VGELAGIAIGSTILL ^V IGGPVT 204
	*.:***:*: ***:***** :*****:***** ^V *.:**:
AtNIP1_1	SAN ^W NPGR ^V LGPAIVYGCYKGIUIYLVAPT ^W LGAAGAVVYNTVRYTDKPLREITKSGSFL 300
Nodulin	QAN ^W NPGR ^V LGPAIVHGEYRG ^V IUIYLLAPVVGAIAGALVYNTIRYTDKPLSETTKSASFL 264
	^W *** ^V *****:*:* *:*****:.*:***** ****:***** * ***:**
AtNIP1_1	KTVRIGST 308
Nodulin	KG-RAASK 271
	* * .*

Abbildung 3: Sequenzvergleich von AtNIP1;1 (AtNIP1_1) und Nodulin 26 (Nodulin); blau: die NPA-Motive: AtNIP1;1 weist im zweiten NPA-Motiv eine ungewöhnliche Ersetzung des normalerweise bei Aquaporinen an dieser Stelle vorhandenen Alanin durch Glyzin auf, bei Nodulin 26 findet man dort ein Valin; grün: die Aminosäuren der ar/R-Region.

Die zweite NIP-Unterfamilie zeichnet sich vor allem durch einen größeren Porendurchmesser im Bereich der ar/R-Region aus, wodurch auch größere ungeladene Moleküle die Pore passieren können. Hinweise auf eine Beteiligung der ar/R-Region an der Selektivität konnte auch für die Ammoniakleitfähigkeit von Aquaporinen erbracht werden (Holm et al., 2005; Beitz et al., 2006).

1.3 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Ammoniak-Leitfähigkeit von NIP-Aquaporinen. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit von AtNIP1;1 mit Nodulin 26 und der identischen Aminosäurezusammensetzung in der ar/R-Region, ist es besonders wahrscheinlich, dass auch AtNIP1;1 eine Leitfähigkeit für Ammoniak besitzt.

Zuvor wurde AtNIP1;1 eine Glyzerin-Leitfähigkeit in einem Hefe-Komplementationstest (Weig et al., 2000) und eine Wasserleitfähigkeit im heterologen *Xenopus laevis*-Oozyten-Expressionssystem nachgewiesen. Die Expression von AtNIP1;1 erhöhte dort die Permeabilität der Plasmamembran von 3.0×10^{-3} cm/s auf 16.4×10^{-3} cm/s (Weig et al., 1997). Untersuchungen zur Quecksilbersensitivität der Wasserleitfähigkeit und die Ermittlung der Aktivierungsenergie für den Wassertransport fehlen bisher.

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, AtNIP1;1 funktionell zu charakterisieren und bei einer vorhandenen Ammoniakleitfähigkeit, die physiologische Funktion und Bedeutung des Aquaporins im pflanzlichen Stickstoffhaushalt zu analysieren. Daraus ergaben sich folgende Aufgabenstellungen:

1. Die Ermittlung der Leitfähigkeit von AtNIP1;1 in einem heterologen *Saccharomyces cerevisiae*-Expressionssystem, besonders im Hinblick auf eine mögliche Ammoniakleitfähigkeit;
2. Die Beantwortung der Frage, in welchen Organen und zu welchen Zeitpunkten AtNIP1;1 in *Arabidopsis thaliana* exprimiert wird;
3. Die Untersuchung der zellulären und subzellulären Lokalisation von AtNIP1;1;
4. Die Analyse der physiologischen Funktion von AtNIP1;1 in der Pflanze mit Hilfe von T-DNA-Insertionslinien.

2. Ergebnisse

2.1 Untersuchungen zur Wasser- und Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1 mittels „Stopped-Flow“-Spektrophotometrie

Die funktionelle Charakterisierung von AtNIP1;1 in Bezug auf seine Wasser- und Ammoniakleitfähigkeit wurde in einem Hefeexpressionssystem vorgenommen. Die Bestimmung der Leitfähigkeit von Aquaporinen in diesem System hat den Vorteil, dass Hefen unkompliziert zu kultivieren und genetisch zu manipulieren sind. Zudem können mit Hilfe der „Stopped-Flow“-Spektrophotometrie viele Klone, die das entsprechende Protein überexprimieren, im Hinblick auf ihre Wasser- und/oder Gaspermeabilität charakterisiert werden. Im Gegensatz zu den ebenfalls gebräuchlichen Permeabilitätsuntersuchungen mit *Xenopus laevis*-Oozyten ist hier ein wesentlich geringerer Zeitaufwand von Nöten.

Die Beantwortung der Frage, für welche Moleküle und in welchem Ausmaß das Aquaporin in einem heterologen System leitfähig ist, kann Hinweise auf eine mögliche physiologische Funktion des Aquaporins in der Pflanze geben.

2.1.1 Untersuchung der Wasserleitfähigkeit

Aquaporine zeichnen sich in der Regel durch eine mehr oder weniger hohe Leitfähigkeit für Wasser aus. Deshalb ist die Ermittlung des Ausmaßes der Wasserleitfähigkeit ein erster Schritt bei der Charakterisierung eines Aquaporins. Eine eher geringe oder nicht vorhandene Erhöhung der Wasserpermeabilität durch die Expression eines Aquaporins in einem heterologen Expressionssystem lässt darauf schließen, dass möglicherweise eine Leitfähigkeit für andere Moleküle vorliegt. Sollte allerdings keine Wasserleitfähigkeit im heterologen System festgestellt werden können, ist es auch denkbar, dass das Protein nicht exprimiert oder nicht korrekt in die Membran eingebaut wird.

Um die Leitfähigkeit von AtNIP1;1 für Wasser zu ermitteln, wurde das Aquaporin in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm 31019b) exprimiert. AtNIP1;1 stand dabei unter der Kontrolle des induzierbaren GAL1-Promoters (Vektor pYES2/CT). Für die Untersuchung der Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1 wurden Hefeprotoplasten mit einem hypoosmolaren Puffer gemischt und die Geschwindigkeit der damit verbundenen Volumenänderung bestimmt. Diese Untersuchung ermöglicht die

Berechnung des Wasserpermeabilitätskoeffizienten der Hefeprotoplasten, der in Anwesenheit von wasserleitfähigen Aquaporinen erhöht ist.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Quecksilbersensitivität der Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1, sowie die Aktivierungsenergie des Wassertransports untersucht.

2.1.1.1 Bestimmung der optimalen Induktionsdauer der Expression von AtNIP1;1 im heterologen Hefe-Expressionssystem

Vorexperimente mit Hefevesikeln zeigten eine leichte Erhöhung der Wasserpermeabilität der Membran, wenn AtNIP1;1 in der Hefe exprimiert wurde. Um den Zeitpunkt zu ermitteln, an dem die maximale Wasserpermeabilität vorliegt, wurde die Wasserpermeabilität der AtNIP1;1-exprimierenden Hefen (Hefestamm 31019b-pYES2-AtNIP1;1) 6, 12, 15, 18, 21 und 24 Stunden nach der Induktion der Expression untersucht. Um einen Vergleich der Änderung der Wasserpermeabilität von Protoplasten AtNIP1;1-exprimierender Hefezellen gegenüber der Wasserpermeabilität der Protoplastenmembran ohne zusätzliches Aquaporin zu erhalten, wurden außerdem Protoplasten von Hefezellen gemessen, die mit dem leeren Vektor pYES2/CT (Hefestamm 31019b-pYES2) transformiert waren. Eine Erhöhung der Wasserpermeabilität der Hefemembran, wenn AtNIP1;1 exprimiert wird, kann durch diesen Vergleich auf eine Wasserleitfähigkeit des Aquaporins zurückgeführt werden.

Die Kinetiken der Streulichtänderung (Abb. 4) gleichen bis zu 12 Stunden nach Beginn der Induktion der Kinetik, die mit Protoplasten einer mit dem leeren pYES2/CT transformierten Hefe gemessen wurde. Eine nennenswerte Zunahme der Geschwindigkeit der Volumenänderung der Protoplasten AtNIP1;1-exprimierender Hefen war erst ab einer 15-stündigen Induktion zu erkennen. Danach konnte eine weitere Erhöhung in der Geschwindigkeit der Streulichtänderung bis zu einem Zeitraum von 21 Stunden Induktion der AtNIP1;1-Expression festgestellt werden.

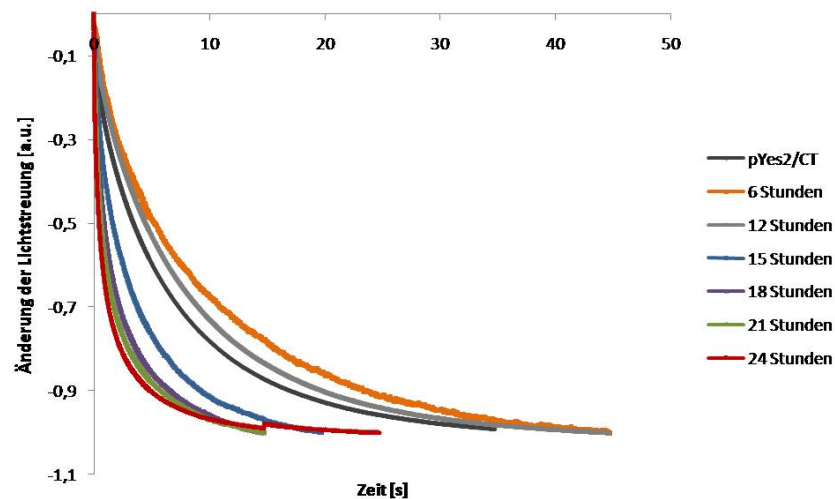


Abbildung 4: Kinetiken der Streulichtänderung als Maß für die Volumenänderung von Protoplasten des Hefestamms 31019b-pYES2-AtNIP1;1 nach einem hypoosmolaren Schock von 300 mosmol; pYES2/CT: Kinetik der Streulichtänderung als Maß der Volumenänderung von Protoplasten des Hefestamms 31019b-pYES2 nach einem hypoosmolarem Schock von 300 mosmol; Zeitangaben in der Legende: Zeit nach Beginn der Induktion der Aquaporin-Expression mit Galaktose.

Für die Berechnung der Wasserpermeabilitätskoeffizienten wurden die Kurven mit der Summe aus zwei Exponentialfunktionen angeglichen, wie in Abbildung 5 exemplarisch gezeigt wird.

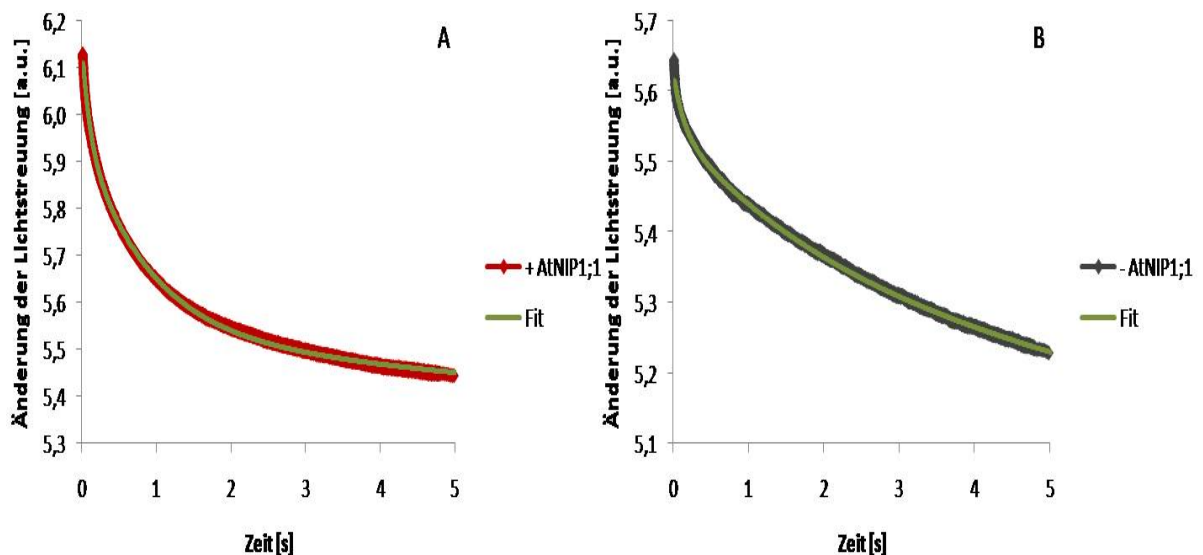


Abbildung 5: Darstellung der angepassten Kurvenverläufe der Kinetiken der Streulichtänderung (A) Kinetik von Protoplasten des Hefestamms 31019b-pYES2-AtNIP1;1 (+AtNIP1;1) mit entsprechendem Fit (B) Kinetik von Protoplasten des Hefestamms 31019b-pYES2 (-AtNIP1;1) mit entsprechendem Fit.

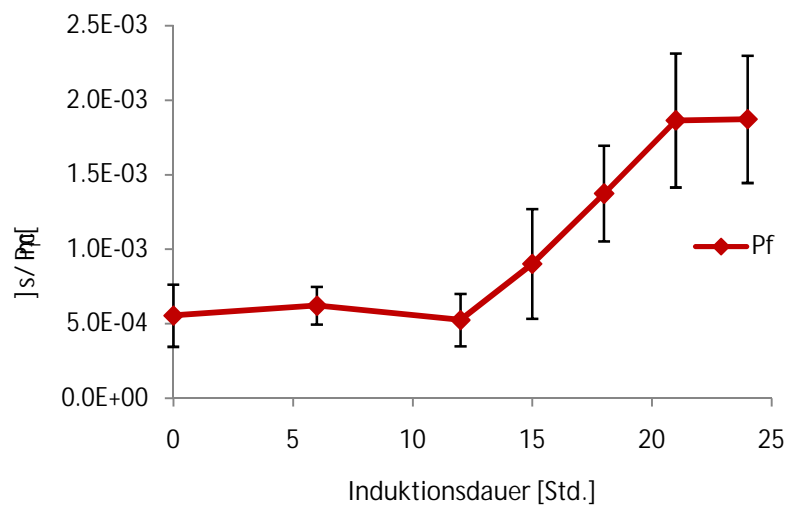


Abbildung 6: Wasserpermeabilitätskoeffizienten von Protoplasten des Hefestammes 31019b-pYES2-AtNIP1;1 in Abhängigkeit von der Dauer der Expressionsinduktion; n=10 bis 15; Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Die graphische Auftragung der berechneten Wasserpermeabilitätskoeffizienten (Abb. 6) verdeutlicht den visuellen Eindruck (Abb. 4), dass der P_f -Wert zunächst bis zu einem Zeitraum von 12 Stunden nach Beginn der Induktion konstant bei $0.5 \cdot 10^{-3} \text{ cm/s}$ blieb. Danach stieg der Wasserpermeabilitätskoeffizient der Hefeprotoplasten bis zu 21 Stunden Induktionsdauer auf $1.86 \cdot 10^{-3} (\pm 0.45 \cdot 10^{-3}) \text{ cm/s}$ an. Bei einer längeren Induktionsdauer von 24 Stunden konnte keine weitere Erhöhung der Wasserpermeabilität festgestellt werden (P_f -Wert= $1.87 \cdot 10^{-3} \text{ cm/s} \pm 0.43 \cdot 10^{-3}$). Für alle folgenden Messungen wurde deswegen eine Induktionszeit von 21 bis 24 Stunden gewählt.

2.1.1.2 Bestimmung der Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1

Im Induktionsexperiment in 2.1.1.1 wurden als Kontrolle Protoplasten von Hefezellen eingesetzt, die mit dem leeren Vektor pYES2/CT (Hefestamm 31019b-pYES2) transformiert waren. Bei allen folgenden Experimenten wurden Protoplasten von Hefezellen als Kontrolle verwendet, die mit dem AtNIP1;1-Hefeexpressionsplasmid transformiert waren (Hefestamm 31019b-pYES2-AtNIP1;1), bei denen aber die Expression von AtNIP1;1 nicht induziert wurde. Dies hat den Vorteil, dass so als Vergleich nicht nur der gleiche Hefestamm dient, sondern dass es sich um die gleiche klonale Hefe handelt.

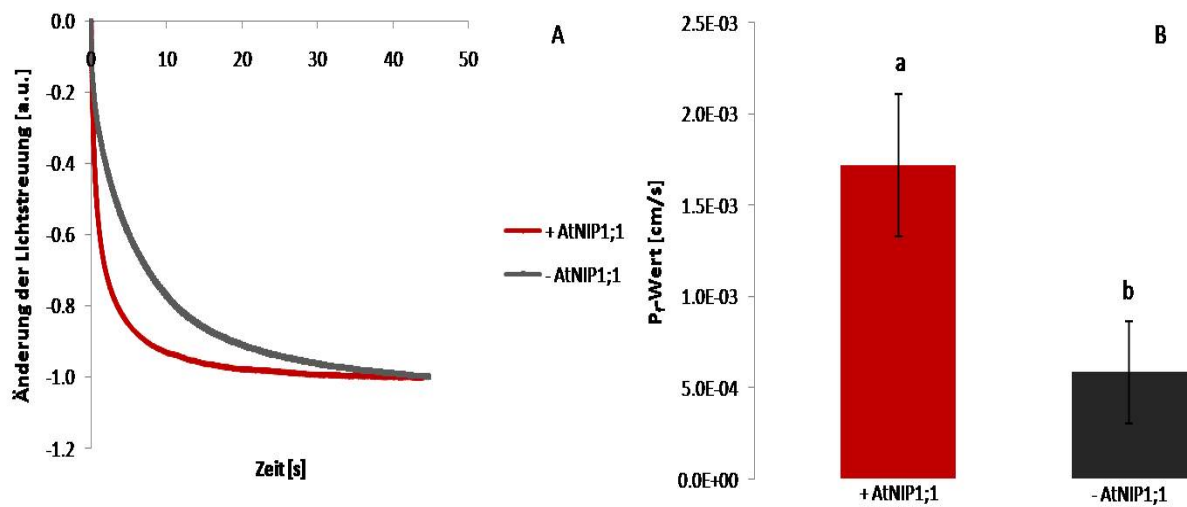


Abbildung 7: (A) Kinetiken der Streulichtänderung als Maß für die Volumenänderung von *S. cerevisiae*-Protoplasten nach einem hypoosmolaren Schock von 300 mosmol (B) Wasserpermeabilitätskoeffizienten von Protoplasten AtNIP1;1-exprimierender (+ AtNIP1;1) und nicht-exprimierender (- AtNIP1;1) Hefen; + AtNIP1;1 n=50, - AtNIP1;1 n=34 in drei unabhängigen Experimenten; unterschiedliche Buchstaben zeigen unterschiedliche Signifikanzgruppen an (t-Test, p-Wert <0.01); Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Die Kinetiken der Streulichtänderung (Abb. 7 A) und die daraus berechneten Wasserpermeabilitätskoeffizienten (Abb. 7 B) zeigen einen klaren Unterschied zwischen den Protoplasten der Hefen, bei denen die Expression von AtNIP1;1 induziert (+ AtNIP1;1) bzw. nicht induziert (- AtNIP1;1) wurde. Durch die Expression von AtNIP1;1 steigt die Wasserpermeabilität der Protoplastenmembran signifikant von $0.6 \cdot 10^{-3} \text{ cm/s}$ ($\pm 0.4 \cdot 10^{-4}$) auf $1.7 \cdot 10^{-3} \text{ cm/s}$ ($\pm 0.3 \cdot 10^{-3}$, t-Test, p-Wert <0.01).

2.1.1.3 Untersuchungen zur Quecksilbersensitivität der Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1

Bei vielen Aquaporinen ist es möglich, die Leitfähigkeit für Wasser mit Hilfe von Quecksilbersalzen zu blockieren. Um eine geeignete Quecksilberchlorid-Konzentration für diese Untersuchung zu bestimmen, wurden die Hefen vor der Messung für 10 min bei Raumtemperatur mit verschiedenen Quecksilberchlorid-Konzentrationen inkubiert.

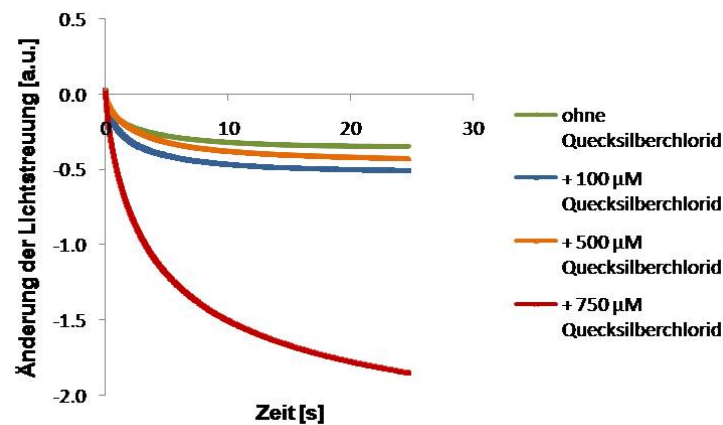


Abbildung 8: Kinetiken der Streulichtänderung als Maß für die Volumenänderung von Protoplasten AtNIP1;1-exprimierender Hefezellen nach einem hypoosmolaren Schock von 300 mosmol und nach Inkubation mit unterschiedlichen Quecksilberchlorid-Konzentrationen.

Dabei zeigte sich, dass ab einer Konzentration von 750 µM Quecksilberchlorid eine Veränderung der Kinetik auftrat (Abb. 8), die keine Änderung in der Geschwindigkeit der Kinetik, sondern eine Änderung der Amplitude der Streulichtänderung darstellte. Somit dürfte diese Änderung nicht auf eine Blockierung der Wasserpore zurückzuführen sein. Die Amplitude veränderte sich so stark, dass von einer Beschädigung der Hefeprotoplasten ausgegangen werden muss. Deshalb wurden die weiteren Untersuchungen mit einer Quecksilberchlorid-Konzentration von 500 µM durchgeführt.

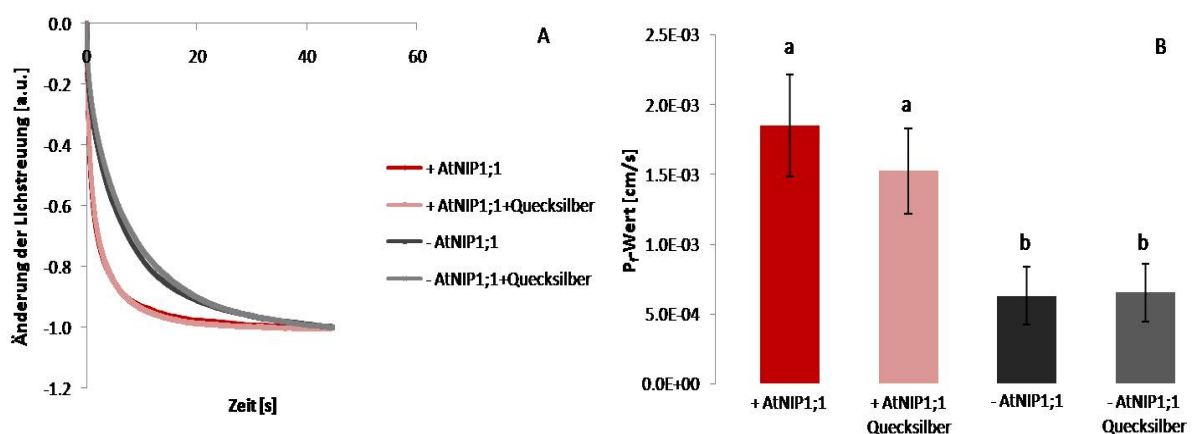


Abbildung 9: Kinetiken der Streulichtänderung als Maß für die Volumenänderung von *S. cerevisiae*-Protoplasten nach einem hypoosmolaren Schock von 300 mosmol (A) Wasserpermeabilitätskoeffizienten von Protoplasten AtNIP1;1-exprimierender (+ AtNIP1;1) und nicht exprimierender (- AtNIP1;1) Hefen mit und ohne Inkubation mit 500 µM Quecksilberchlorid; + AtNIP1;1 n=22, + AtNIP1;1+Quecksilber n=26, - AtNIP1;1 n=19, - AtNIP1;1+ Quecksilberchlorid n=21 in zwei unabhängigen Experimenten; unterschiedliche Buchstaben zeigen unterschiedliche Signifikanzgruppen an (ANOVA, p-Wert <0.01); Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Nach der Behandlung mit Quecksilberchlorid zeigte sich keine signifikante Änderung der Wasserpermeabilität der Protoplasten, unabhängig davon, ob AtNIP1;1 in den entsprechenden Hefen exprimiert wurde oder nicht (Abb. 9 A und Abb. 9 B).

2.1.1.4 Untersuchungen zur Temperatur-Abhängigkeit der Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1

Ein klarer Hinweis für den proteinvermittelten Transport eines Moleküls ist eine verringerte Aktivierungsenergie, wenn das entsprechende Protein exprimiert wird. Diese lässt sich mittels eines Arrhenius-Plots ermitteln. Hierfür wurde die Wasserpermeabilität von Protoplasten AtNIP1;1-exprimierender und nicht exprimierender Hefezellen bei Temperaturen von 10 °C bis 30 °C gemessen.

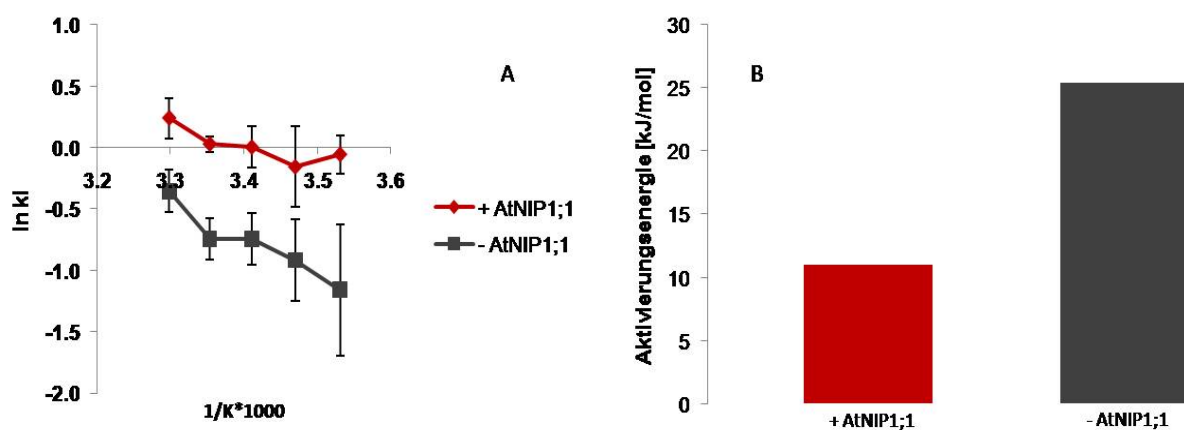


Abbildung 10: (A) Arrhenius Plot für die Wasserpermeabilität von Protoplasten AtNIP1;1-exprimierender (+AtNIP1;1) und nicht-exprimierender Hefen (- AtNIP1;1); n=12 bis 22, zwei unabhängige Experimente (B) Darstellung der Aktivierungsenergie des Wassertransport.

Der Einfluss der Temperatur auf die Wasserpermeabilität der Protoplastenmembran war dabei verringert, wenn AtNIP1;1 exprimiert wurde. Dies zeigt sich deutlich anhand der Steigung im Arrhenius Plot (Abb. 10 A). Die Berechnung der Aktivierungsenergie aus den Steigungen ergab bei Expression von AtNIP1;1 fast eine Halbierung der Aktivierungsenergie von 25.45 kJ/mol auf 10.99 kJ/mol (Abb. 10 B).

2.1.2 Untersuchung der Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1

Neben den Wasserpermeabilitätsmessungen wurden Ammoniakpermeabilitätsmessungen mit AtNIP1;1-exprimierenden Hefezellen an einem „Stopped-Flow“-Spektrophotometer durchgeführt. Um die Ammoniakleitfähigkeit mittels „Stopped-

Flow“- Spektrophotometrie bestimmen zu können, wurden Hefezellen mit einem pH-sensitiven Fluoreszein beladen.

Wenn Ammoniak die Hefemembran passiert, kommt es zu einer Änderung des pH-Wertes in der Hefezelle, weil Ammoniak dort Protonen aufnimmt. Der pH-Wert im Zytosol der Hefezelle steigt an und die Fluoreszenzintensität ändert sich entsprechend. Als Maß für die Geschwindigkeit dieser Änderung wurde die anfängliche Steigung einer Kurve in den ersten 0,5 Sekunden ermittelt, da die Kinetiken in diesem Zeitraum einen annähernd linearen Verlauf zeigten (Abb. 11 A).

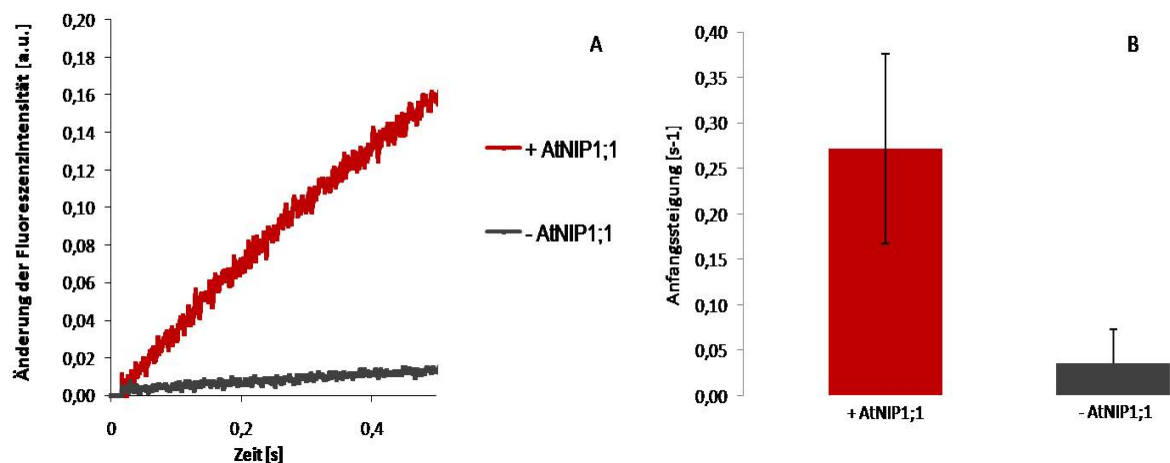


Abbildung 11: Kinetiken von *S. cerevisiae*-Hefezellen nach Zugabe von 25 mM Ammoniumchlorid (B) Anfangssteigung der Kinetiken von AtNIP1;1-exprimierenden (+ AtNIP1;1) und nicht exprimierenden (- AtNIP1;1) Hefezellen ; + AtNIP1;1 n=55, - AtNIP1;1 n=40 in vier unabhängigen Experimenten; unterschiedliche Buchstaben zeigen unterschiedliche Signifikanzgruppen an (t-Test, p-Wert < 0.01); Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

In Abbildung 11 A ist die erste halbe Sekunde der Messungen gezeigt. Dabei ist in Hefezellen, die AtNIP1;1 exprimierten, ein schnellerer Anstieg der Fluoreszenzintensität, als in den AtNIP1;1 nicht exprimierenden Zellen zu erkennen (Abb. 11 B).

2.1.2.1 Untersuchungen zur Quecksilbersensitivität der Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1

Weiterhin wurde untersucht, ob die Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1 mit Hilfe von Quecksilberchlorid blockiert werden kann. In Abbildung 12 A ist eine Verlangsamung der Kinetik zu erkennen, wenn AtNIP1;1-exprimierende Hefezellen mit Quecksilberchlorid behandelt wurden. Bei Hefezellen, die AtNIP1;1 nicht

exprimierten, gab es keinen Effekt des Quecksilberchlorids auf die Leitfähigkeit für Ammoniak.

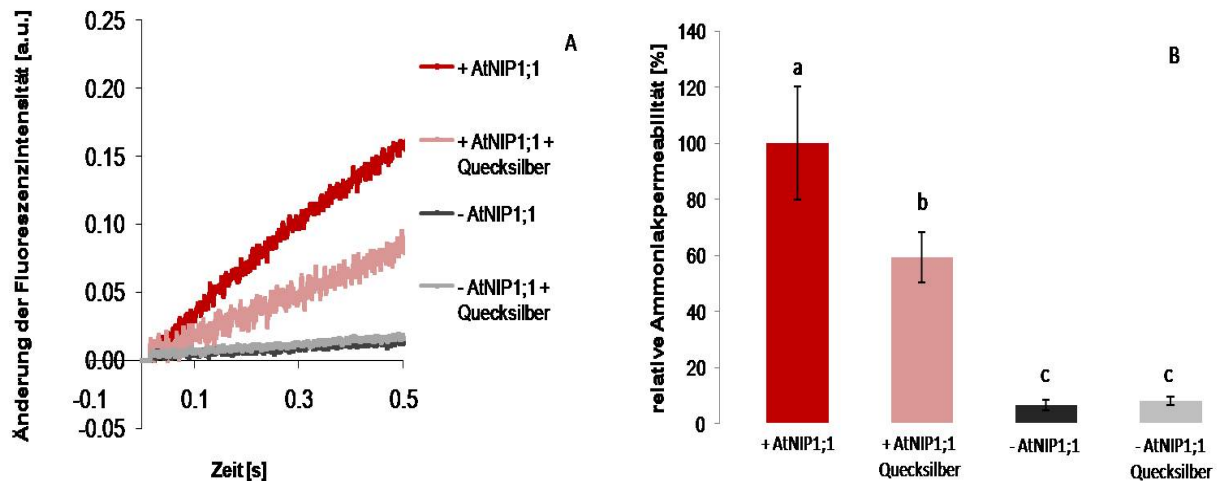


Abbildung 12: : Kinetiken von *S. cerevisiae*-Hefezellen nach Zugabe von 25 mM Ammoniumchlorid mit und ohne Inkubation mit 500 µM Quecksilberchlorid (B) relative Ammoniakpermeabilität von AtNIP1;1-exprimierenden (+ AtNIP1;1) und nicht exprimierenden (- AtNIP1;1) Hefezellen mit und ohne Inkubation mit 500 µM Quecksilberchlorid; + AtNIP1;1 n=16, + AtNIP1;1+Quecksilber n=15 - AtNIP1;1 n=10, - AtNIP1;1+ Quecksilber n=10 in zwei unabhängigen Experimenten; unterschiedliche Buchstaben zeigen unterschiedliche Signifikanzgruppen an (ANOVA, p-Wert < 0.01); Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Es zeigte sich eine um ca. 40% verminderte Ammoniakpermeabilität, wenn AtNIP1;1-exprimierende Zellen zuvor mit 500 µM Quecksilberchlorid inkubiert wurden (Abb. 12 B).

2.1.2.2 Untersuchungen zur Temperatur-Abhängigkeit der Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1

Ebenso wie der Wassertransport wurde auch der Ammoniaktransport in die Hefezellen daraufhin untersucht, ob es zu einer Verringerung der Aktivierungsenergie kommt, wenn AtNIP1;1 exprimiert wird.

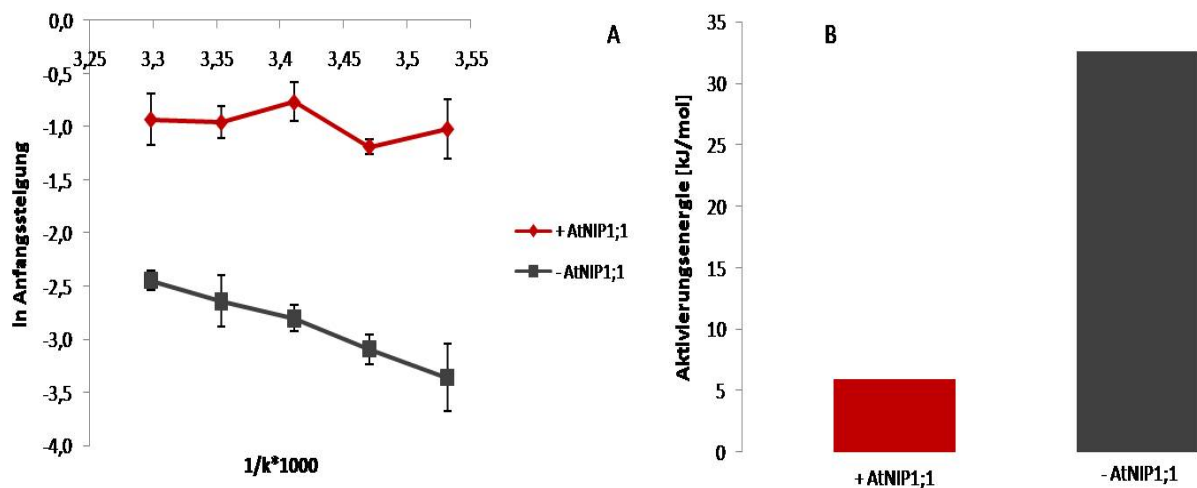


Abbildung 13: (A) Arrhenius-Plot für die Ammoniakpermeabilität AtNIP1;1-exprimierender (+AtNIP1;1) und nicht-exprimierender Hefezellen (- AtNIP1;1); n=12 bis 22, zwei unabhängige Experimente (B) Darstellung der Aktivierungsenergie des Ammoniaktransports.

Aus dem Arrhenius Plot (Abb. 13 A) wurden die Aktivierungsenergien für den Ammoniaktransport in AtNIP1;1-exprimierende und nicht-exprimierende Hefezellen mit Hilfe der Steigungen errechnet (Abb. 13 B). Dabei zeigte sich eine geringere Aktivierungsenergie von 5.94 kJ/mol für den Ammoniaktransport in Hefezellen, wenn AtNIP1;1 exprimiert wurde. Wurde AtNIP1;1 nicht exprimiert, lag die Aktivierungsenergie für diesen Prozess bei 32.57 kJ/mol.

2.1.2.3 AtNIP1;1: Leitfähig für Ammonium oder Ammoniak?

Messungen der Ammoniakpermeabilität der Hefezellen bei unterschiedlichen pH-Werten können einen Hinweis darauf geben, ob eine Ammonium- oder eine Ammoniakleitfähigkeit des Aquaporins vorliegt. Bei einem höheren pH-Wert liegt im Verhältnis mehr Ammoniak im Puffer vor, so dass mit einem steigenden pH-Wert eine erhöhte Leitfähigkeit des Aquaporins festgestellt werden sollte, wenn Ammoniak das geleitete Molekül ist. Um dies zu überprüfen, wurden an AtNIP1;1-exprimierenden Hefezellen und Hefezellen, die AtNIP1;1 nicht exprimierten, Ammoniakpermeabilitäts-Messungen mit Aufnahme- und Mischpuffern bei pH 8.0 und pH 9.0 vorgenommen.

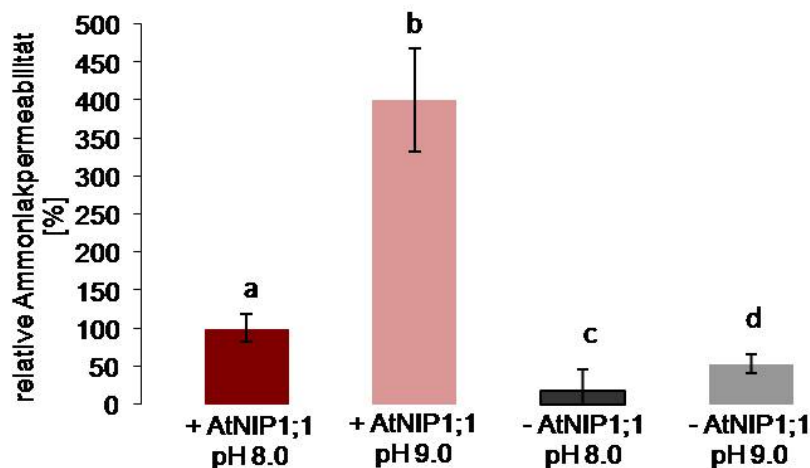


Abbildung 14: relative Ammoniakpermeabilität von AtNIP1;1-exprimierenden (+ AtNIP1;1) und nicht exprimierenden (- AtNIP1;1) Hefezellen bei pH 8.0 und pH 9.0; + AtNIP1;1 pH 8.0, n=17, + AtNIP1;1 pH 9.0 n=21, - AtNIP1;1 pH 8.0 n=11, - AtNIP1;1 pH 9.0 n=21 in zwei unabhängigen Experimenten; unterschiedliche Buchstaben zeigen unterschiedliche Signifikanzgruppen an.

Abbildung 14 zeigt einen Anstieg der Permeabilität der Hefezellen für Ammoniak von pH 8.0 zu pH 9.0, unabhängig von der Expression von AtNIP1;1.

2.2 Untersuchungen zur Expression von AtNIP1;1 in *Arabidopsis thaliana*

2.2.1 Auswertung von Microarray-Daten

Mit Hilfe von Microarray-Daten, die auf der Genevestigator-Homepage (Zimmermann et al., 2004) zur Verfügung stehen, konnte eine Analyse der Expression von AtNIP1;1 in der Pflanze vorgenommen werden. Genevestigator ermöglicht die einfache Ausführung von virtuellen Northern Blots mit den vorhandenen Daten. Die Daten wurden mit dem Affymetrix-Chip Ath1 gewonnen. Auf diesem Chip sind mehr als 22 500 Oligonukleotide aufgetragen, die ca. 24 000 Gene von *Arabidopsis thaliana* repräsentieren. Eine Hybridisierung des Chips mit unterschiedlicher *A. thaliana*-RNA ermöglicht Aussagen über die Expression von Genen in den pflanzlichen Organen, in den verschiedenen Entwicklungsstadien, sowie unter Stressbedingungen. Ein großer Vorteil, grade für die Untersuchungen des Expressionszeitpunkt und des Expressionsorts eines Gens, ist, dass eine große Anzahl unabhängiger Experimente einfließt. Somit ist es möglich, zuverlässige Aussagen über die Transkription eines bestimmten Gens zu treffen.

2.2.1.1 Untersuchung der Expression von AtNIP1;1 in *Arabidopsis thaliana*

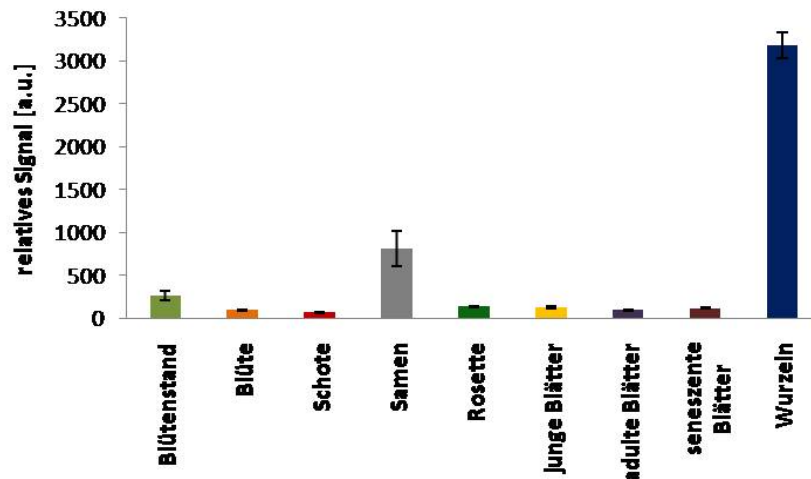


Abbildung 15: Expression von AtNIP1;1 in verschiedenen pflanzlichen Organen von *A. thaliana*; Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Die Auswertung der Daten ergab, übereinstimmend mit Ergebnissen von Alexandersson et al. (2005), eine hohe Expression von AtNIP1;1 in den Wurzeln von *A. thaliana* (Abb. 15). In den meisten anderen Pflanzenorganen findet im Vergleich dazu nur eine geringe Expression von AtNIP1;1 statt. Einzig in den Samen von *Arabidopsis thaliana* kann ebenfalls eine erhöhte Expression festgestellt werden.

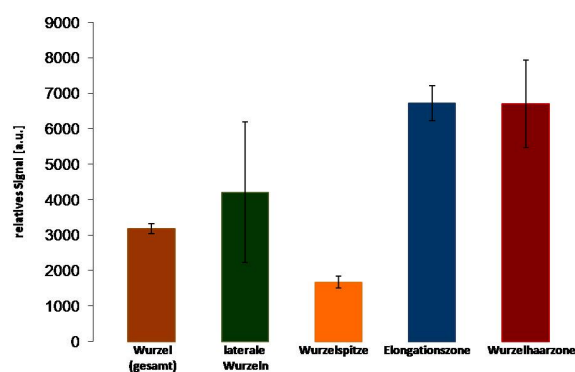


Abbildung 16: Expression von AtNIP1;1 in verschiedenen Bereichen der Wurzel von *A. thaliana*; Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung.

Betrachtet man die Expression innerhalb der Wurzel genauer (Abb. 16), findet man die höchste Expression in der Elongations- und der Wurzelhaarzone.

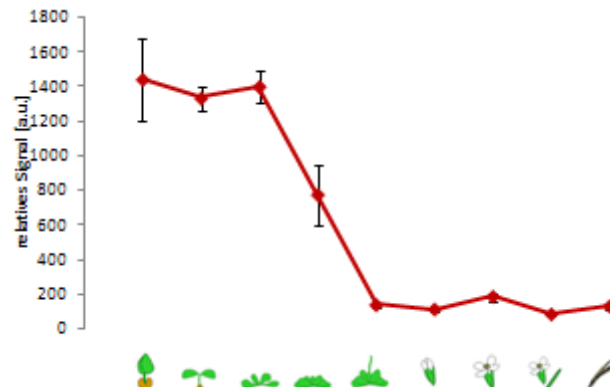


Abbildung 17: Expression von AtNIP1;1 in den verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. thaliana*, vom Keimling bis zur Pflanze mit reifen Samen; Fehlerindikatoren zeigen die Standardabweichung; Bilder (Zimmermann et al., 2004) unter der Graphik zeigen Pflanzen im Alter von: 1. 1-6 Tage (Keimling); 2. 6-14 Tage (Zweiblatt-Stadium); 3. 14-18 Tage (Vierblatt-Stadium); 4. 18-21 Tage (voll ausgebildete Rosette); 5. 21-25 Tage (beginnender Blütenstand); 6. 25-29 Tage (beginnende Blüte); 7. 29-36 Tage (Blüte); 8. 36-45 Tage (Blüte und erste Schoten); 9. 45-50 Tage (Samenreife).

Bei einem Blick auf die Expression in der Pflanze in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums (Abb. 17) ist zu erkennen, dass das Transkriptionsniveau von AtNIP1;1 in Keimlingen und jungen Pflanzen am höchsten ist. Nach dem Erreichen des Vierblatt-Stadiums nimmt die Expression ab, bis die Pflanze anfängt, den Blütenstand zu bilden. Während des Beginns der Blüte bis zur vollständigen Ausreifung der Samen bleibt die Expression von AtNIP1;1 konstant auf einem niedrigen Niveau.

2.2.1.2 Untersuchung der Expression von AtNIP1;1 in Abhängigkeit verschiedener Stressfaktoren

Um die physiologische Funktion eines Aquaporins zu ermitteln, können Experimente unter bestimmten Stressbedingungen wichtige Hinweise liefern. Bei Genevestigator ist eine Vielzahl von Experimenten zu finden, die unter Stressbedingungen durchgeführt wurden. In dieser Arbeit wurden jene Microarray-Experimente ausgewertet, bei denen die Wasser- bzw. Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1 eine Rolle spielen könnte. Zunächst wurde eine Reihe von Experimenten betrachtet, bei denen man aufgrund der Wasserleitfähigkeit des Aquaporins einen Einfluss auf die Expression von AtNIP1;1 vermuten könnte.

In dieser Reihe der Experimente (Kilian et al., 2007) wurden die Pflanzen 18 Tage nach dem Aussäen und 3 Stunden nach dem Wechsel von Dunkel zu Licht

Stressbedingungen ausgesetzt. Die RNA-Proben für die Kontrollpflanzen wurden von Pflanzen genommen, die keinen Stressbedingungen ausgesetzt waren, aber davon abgesehen den anderen Pflanzen entsprechend behandelt wurden. Auffallend ist dabei generell ein starker Abfall in der Expression von AtNIP1;1 bei den Kontrollpflanzen nach 6 Stunden Licht (Abb. 18 und 19). Die Daten zu diesem Zeitpunkt lassen sich so nur schwer mit denen der Stressexperimente vergleichen. Möglicherweise liegt eine tageszeitabhängige Expression von AtNIP1;1 vor.

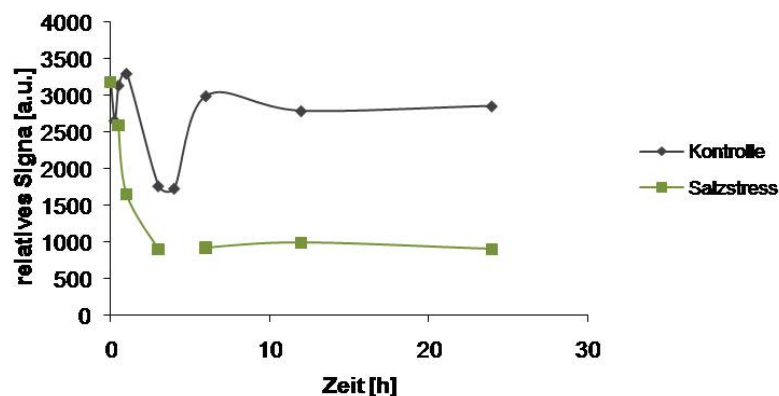


Abbildung 18: Expression von AtNIP1;1 bei *A. thaliana*-Pflanzen mit und ohne Salzstress;; Kontrolle: RNA aus Pflanzen, die keinem Salzstress ausgesetzt wurden; Salzstress: RNA aus Pflanzen mit kontinuierlichem Salzstress durch Zugabe von 150 mM NaCl in das Medium.

In Abbildung 18 ist die Expression von AtNIP1;1 in Abhängigkeit von kontinuierlichem Salzstress gezeigt. Bei Salzstress ist eine Regelung des Wasserstroms für die Pflanze essentiell, um nicht zu große Wasserverluste zu erleiden. Deshalb ist es denkbar, dass es einen Einfluss des Salzstress auf die Expression des wasserleitfähigen AtNIP1;1 gibt.

Es zeigt sich bei anhaltendem Salzstress eine dauerhaft um ca. 70 % erniedrigte Expression von AtNIP1;1 im Vergleich zur Kontrolle.

Ein ähnliches Ergebnis liefert ein Experiment, bei dem die Pflanzen dauerhaft osmotischem Stress ausgesetzt wurden. Auch hier ist es für die Pflanze von entscheidender Bedeutung den Wasserverlust zu minimieren.

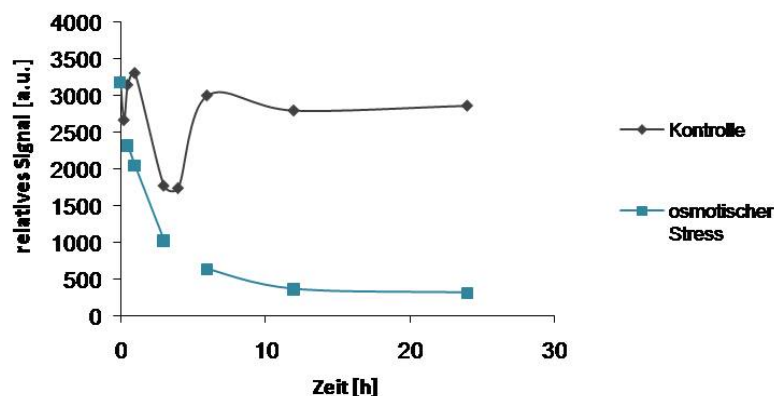


Abbildung 19: Expression von AtNIP1;1 bei *A. thaliana*-Pflanzen mit und ohne osmotischen Stress; Kontrolle: RNA aus Pflanzen, die keinem osmotischen Stress ausgesetzt wurden; osmotischer Stress: RNA aus Pflanzen mit kontinuierlichem osmotischen Stress durch Zugabe von 300 mM Mannitol in das Medium.

Abbildung 19 zeigt eine starke, dauerhafte Abnahme der Expression von AtNIP1;1 im Verlauf des Experiments. Bei den osmotischen Stressbedingungen, denen die Pflanze ausgesetzt wurden, verringert sich die Expression um fast 90%.

Neben der Wasserleitfähigkeit konnte im heterologen Hefeexpressionssystem eine Ammoniakleitfähigkeit für AtNIP1;1 nachgewiesen werden. Somit sind auch Microarray-Experimente, die unter Stickstofflimitierung durchgeführt wurden, von Interesse. Bei diesem Experiment (Scheible et al., 2004) wurden die Keimlinge in Flüssigkultur bei kontinuierlichem Licht angezogen, um diurnale Änderungen zu vermeiden. Zunächst wurden die Pflanzen für 7 Tage in einem Medium mit ausreichender Stickstoffversorgung angezogen. Anschließend wurden ein Teil der Keimlinge in ein Medium mit wenig Stickstoff umgesetzt. Nach 9 Tagen wurde von einigen Pflanzen RNA isoliert. Andere Pflanzen im Medium mit wenig Stickstoff erhielten nun eine Zugabe von 3 mM KNO_3 oder 3 mM KCl als Kontrolle. Die Pflanzen wurden 30 Minuten beziehungsweise 3 Stunden später geerntet und die RNA isoliert.

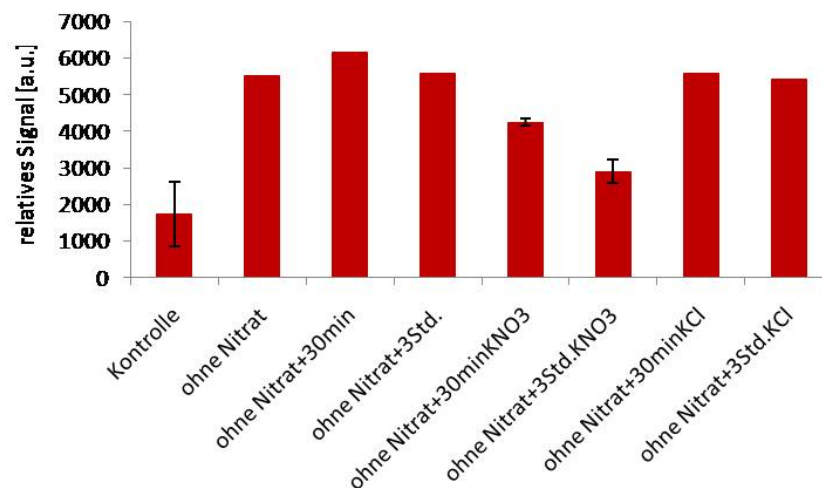


Abbildung 20: Einfluss von Nitratmangel und anschließender Nitratzugabe auf die Expression von AtNIP1;1 in *A. thaliana*; Kontrolle: Pflanzen mit normaler Stickstoffversorgung; Zeitangaben zeigen den Zeitpunkt der Probennahme nach Gabe von KNO_3 , KCl oder ohne zusätzliche Zugabe.

Abbildung 20 zeigt die Reaktion des Transkriptions-Levels von AtNIP1;1 auf den Nitrat-Mangel in diesem Experiment. Bei Pflanzen mit normaler Stickstoff-Versorgung ist die Expression von AtNIP1;1 deutlich niedriger als bei Pflanzen, die in einem Medium mit geringer Stickstoffkonzentration wuchsen. Mit dem Entzug des Stickstoffs stieg die Expression von AtNIP1;1 etwa um das Dreifache an. Nach der Zugabe von 3 mM KNO_3 zeigt sich nach einer halben Stunde ein leichter Rückgang der Expression, der nach 3 Stunden noch nicht wieder das ursprüngliche Niveau (im Vergleich zur Kontrolle) erreicht. Bei einer Zugabe von 3 mM KCl bleibt die Expression von AtNIP1;1 unverändert hoch, das heißt der Rückgang der Genexpression ist vom Nitrat abhängig.

2.2.2 GUS-Test zur Lokalisation der Genexpression

Für eine Untersuchung der gewebsspezifischen Expression von AtNIP1;1 wurde der AtNIP1;1-Promotor im Vektor pMDC164 vor das Reportergen Glucuronidase (GUS) kloniert. Mit diesem Konstrukt wurden *A. thaliana*-Pflanzen mit Hilfe der „Floral-Dip“-Methode stabil transformiert.

2.2.2.1 Lokalisation der AtNIP1;1-Promotor-Aktivität

Für die Untersuchungen wurden sowohl 9 Tage als auch 3 Wochen alte Pflanzen verwendet. Nach dem Anfärben zeigte sich eine GUS-Aktivität in den Wurzeln und auch in den Blättern.

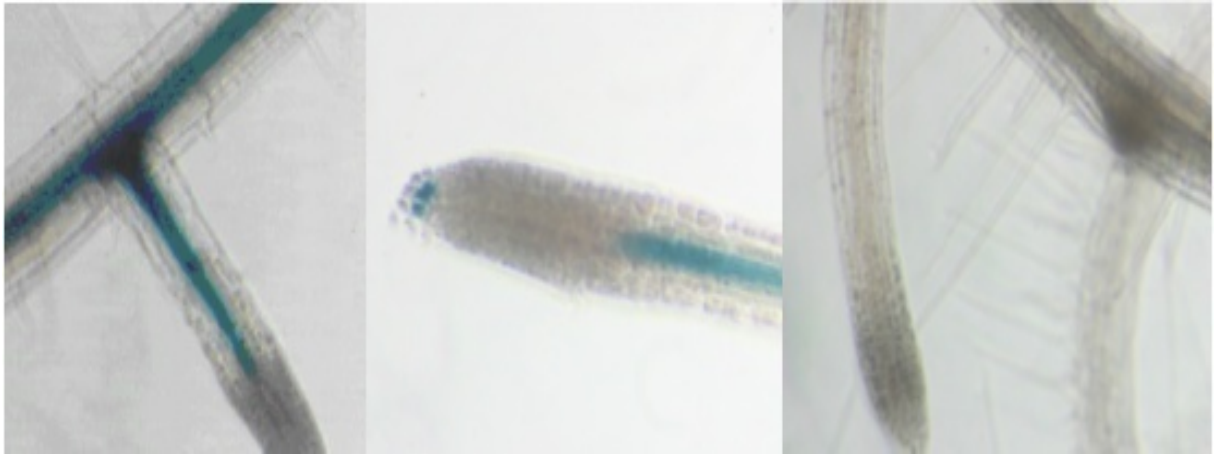


Abbildung 21: GUS-Färbung von *A. thaliana*-Wurzeln (A und B) mit GUS-AtNIP1;1-Promotor-Konstrukt transformierte Pflanzen (C) untransformierte Pflanzen.

In Abbildung 21 A und 21 B ist deutlich die Aktivität des Reportergens im Zentralzylinder der Wurzeln zu erkennen. Bei einer Betrachtung der Wurzelspitze zeigt sich auch dort eine Aktivität des AtNIP1;1-Promotors im Bereich der Stammzellen. In Abbildung 21 C ist der Wurzelbereich einer nicht transformierten Pflanze zu sehen, die ebenfalls einer GUS-Färbung unterzogen wurde. In solchen Fällen war keine Anfärbung im Gewebe zu erkennen.

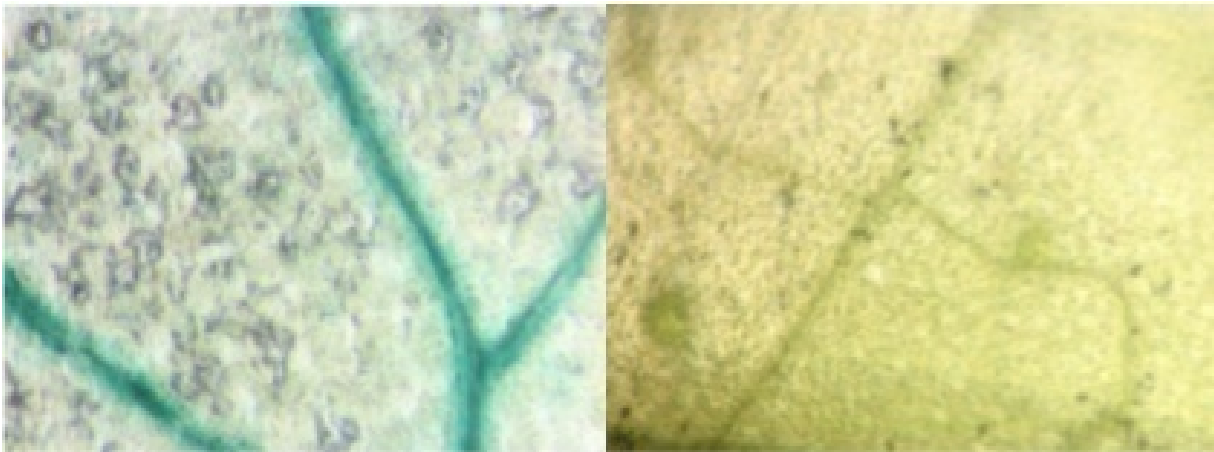


Abbildung 22: GUS-Färbung von *A. thaliana*-Blättern (A) mit GUS-AtNIP1;1-Promotor-Konstrukt transformierte Pflanzen (B) untransformierte Pflanzen.

Bei der Betrachtung der Blätter zeigt sich bei den transformierten Pflanzen eine GUS-Färbung in den Leitgefäßen (Abb. 22 A), während bei untransformierten Pflanzen keine Färbung zu erkennen ist (Abb. 22 B).

2.3 Zelluläre Lokalisation von AtNIP1;1 mittels mGFP4

2.3.1 Untersuchung der zellulären Lokalisation von AtNIP1;1

Für die Ermittlung der zellulären Lokalisation wurde AtNIP1;1 (orf) unter der Kontrolle von 2 35SCamV-Promotoren mit mGFP4 (Vektor pPily) fusioniert. Mit diesem Konstrukt wurden Zwiebelzellen transient transformiert und anschließend mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert.

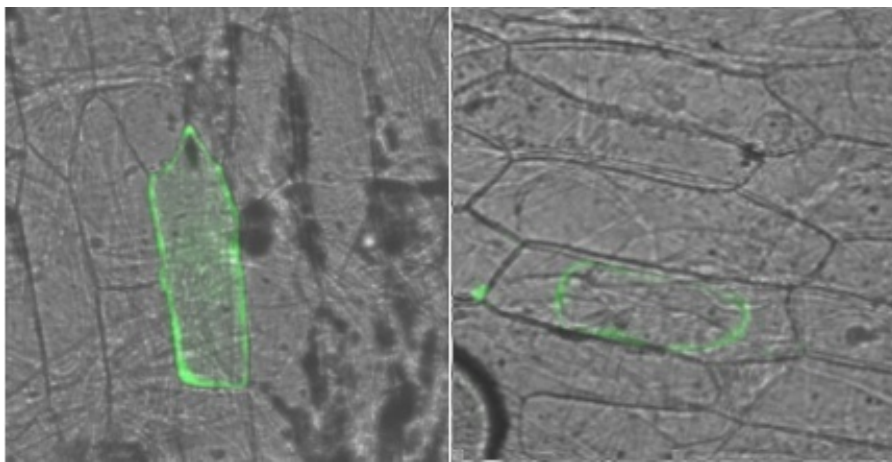


Abbildung 23: (A) Mikroskopischer Ausschnitt einer transformierten Zwiebelzelle. (B) Mikroskopischer Ausschnitt einer transformierten und plasmolysierten Zwiebelzelle. Ein AtNIP1;1-mGFP4-cDNA-Konstrukt wurde transient in Zellen der Zwiebelschuppen-Epidermis transformiert und das AtNIP1;1-GFP-Fusionsprotein unter dem CLSM beobachtet.

Die Abbildung 23 A zeigt eine Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme. Dabei ist zu erkennen, dass sich die Fluoreszenz definiert um die Zwiebelzelle herum befindet. Abbildung 23 B zeigt eine plasmolysierte Zelle. Hier wird deutlich, dass die mGFP4-Fluoreszenz in der Plasmamembran der Zwiebelzellen lokalisiert ist.

2.4 Charakterisierung von AtNIP1;1-T-DNA-Insertionsmutanten

Für die Untersuchung der physiologischen Funktion von AtNIP1;1 in der Pflanze standen zwei *A. thaliana*-T-DNA-Insertionslinien zur Verfügung. Bei diesen Linien (N516617 und N517916) wurde mittels *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in die genomische Sequenz von AtNIP1;1 eingefügt. Die Linien stammten vom NASC-Institut in Nottingham (Alonso et al., 2003). Die Insertion der ca. 4000 bp großen T-DNA in die genomische Sequenz sollte einen negativen Einfluss auf Transkription von AtNIP1;1

haben. Bevor mit den T-DNA-Insertions-Linien physiologische Experimente durchgeführt werden können, müssen folgende Fragestellungen überprüft werden:

- Liegt die T-DNA-Insertion tatsächlich an der vom Hersteller angegebenen Stelle?
- Liegt die T-DNA-Insertion in AtNIP1;1 homolog oder heterolog vor?
- Gibt es tatsächlich nur an einer Stelle des Genoms eine T-DNA-Insertion?
- Welchen Einfluss hat die T-DNA-Insertion auf die Transkription von AtNIP1;1?

Erst wenn sichergestellt ist, dass in den Pflanzen nur eine T-DNA-Insertion in AtNIP1;1 vorliegt und bekannt ist, in welchem Maße die Insertion auch die Transkription von AtNIP1;1 beeinflusst, können mögliche Phänotypen der Pflanzen und Ergebnisse in pflanzenphysiologischen Experimenten eindeutig auf eine veränderte AtNIP1;1-Expression zurückgeführt werden.

2.4.1 Nachweis der Insertionsstelle der T-DNA in den Linien N516617 und N517916

Für den Nachweis der T-DNA-Insertionsstellen wurde genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen (N516617, N517916 und Wildtyp var. Col) isoliert. Zunächst wurde mit genspezifischen Primern überprüft, ob eine Amplifikation von AtNIP1;1 aus der genomischen DNA möglich war. Bei einer Insertion der T-DNA innerhalb des AtNIP1;1-Gens sollte mit Standard-Elongationszeit für AtNIP1;1 aufgrund der Größe der T-DNA keine Amplifikation möglich sein.

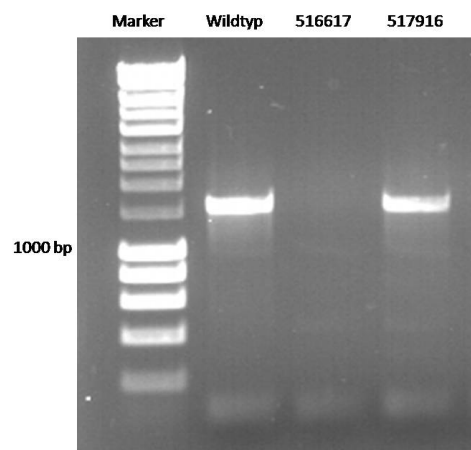


Abbildung 24: Amplifikation von AtNIP1;1 mit genspezifischen Primern aus der genomischen DNA von *A. thaliana* var. Col. (Wildtyp), N516617 und N517916.

Bei der Linie N516617 wurde kein Amplifikat erhalten, während sowohl wie erwartet beim Wildtyp, als auch bei N517916 eine Amplifikation möglich war (Abb. 24). Für das Ergebnis für die Linie N517916 gibt es mehrere mögliche Erklärungen:

- es liegt keine Insertion in AtNIP1;1 vor
- die Insertion liegt im Genom heterolog vor
- die Insertion liegt außerhalb der amplifizierten Region

Mit Hilfe von T-DNA-spezifischen Primern konnte nachgewiesen werden, dass eine T-DNA-Insertion auch bei den untersuchten N517916-Pflanzen vorlag. Um genau zu bestimmen, wo diese bei den untersuchten Linien liegt, wurden PCR-Reaktionen mit AtNIP1;1- und T-DNA-spezifischen Primern durchgeführt (Abb. 25 A).

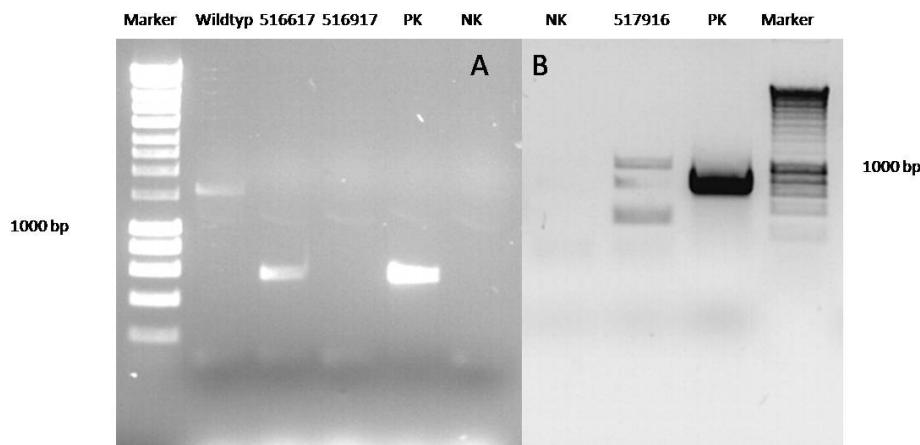


Abbildung 25 (A) Amplifikation mit T-DNA- und AtNIP1;1-spezifischen Primern aus der genomischen DNA von Wildtyp (*A. thaliana* var. Col.), N516617 und N517916; Wildtyp: Amplifikation mit genspezifischen Primern; 516617 und 517916: Amplifikation mit T-DNA- und AtNIP1;1-spezifischen Primern; PK (Positivkontrolle): Amplifikation mit T-DNA-spezifischen Primern mit genomischer DNA als Matrize, aus der zuvor schon T-DNA amplifiziert werden konnte; NK (Negativkontrolle): Amplifikation mit T-DNA- und AtNIP1;1-spezifischen Primern auf Wildtyp-DNA (B) 3. TAIL-PCR; NK (Negativkontrolle): TAIL-PCR auf Wildtyp-DNA; PK (Positivkontrolle): Amplifikation von AtNIP1;1 mit genspezifischen Primern mit Vektor pYES2/CT-AtNIP1;1 als Matrize; 517916: 3. Tail-PCR mit genomischer DNA der entsprechenden T-DNA-Insertionslinie.

Für die Linie N516617 konnte dabei ein Amplifikat erhalten werden, dass im Anschluss sequenziert wurde. Für die Linie N517916 konnte kein Amplifikat erhalten werden, es wurde deshalb die Methode der TAIL-PCR angewendet. Die dabei erhaltenen PCR-Produkte wurde sequenziert (Abb. 25 B, Sequenzen im Anhang). Dabei zeigte sich,

dass auch in dieser Linie eine T-DNA-Insertion in der genomischen Sequenz von AtNIP1;1 vorlag (Übersicht in Abb. 26).

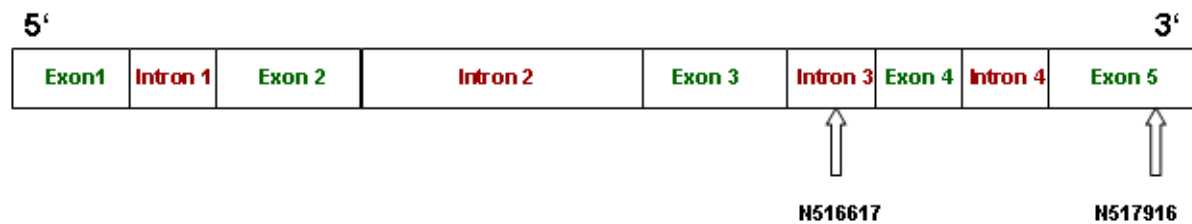


Abbildung 26: Schematischer Überblick über die genomische Sequenz von AtNIP1;1. Die Exons und Introns sowie die T-DNA-Insertionsstellen der Linien N516617 und N517916 sind markiert.

Für die Linie N516617 wurde die Insertion im Intron 3 nachgewiesen, für die Linie N517916 im Exon 5, allerdings sehr weit am Ende des AtNIP1;1-Gens. Dies dürfte auch der Grund für die vorherigen negativen PCR-Ergebnisse sein, da aufgrund der Lage und Orientierung der T-DNA-Insertion das entstehende Amplifikat in der zweiten PCR keine 100 bp groß wäre. Allerdings hätte auch in der ersten PCR mit den AtNIP1;1-spezifischen Primern kein PCR-Produkt entstehen dürfen. So ist es wahrscheinlich, dass die T-DNA-Insertion in der Linie N517916 heterolog vorliegt.

2.4.2 Nachweis der Anzahl der T-DNA-Insertionen in den Linien N516617 und N517916

In T-DNA-Insertionslinien liegt zunächst in etwa 50 % der Fälle mehr als eine Insertion vor. Um zu überprüfen, ob in den Linien N516617 und N517916 mehrere T-DNA-Insertionen vorhanden sind, wurde die Methode des Southern Blots angewendet. Die genomische DNA wurde über Nacht mit den Enzymen BamHI und EcoRI, die beide in der T-DNA schneiden, abgebaut (Abb. 27 A). Für den Nachweis der T-DNA-Insertionen im Southern Blot wurde die „DIG-Detektions“-Methode der Firma Roche angewendet. Die verwendete Sonde richtete sich spezifisch gegen einen etwa 700 bp großen Teil der T-DNA. Die für den Restriktionsabbau verwendeten Enzyme schnitten hierbei nicht im Bereich der Sonde.

Bei der Detektion zeigten sich bei Pflanzen ohne T-DNA-Insertion keine Signale, so dass von einer Spezifität der Sonde ausgegangen werden kann. In der Linie N517916 waren drei T-DNA-Insertionen vorhanden und in der Linie N516617 gab 2 bis drei T-DNA-Insertionen (Abb. 27 B).

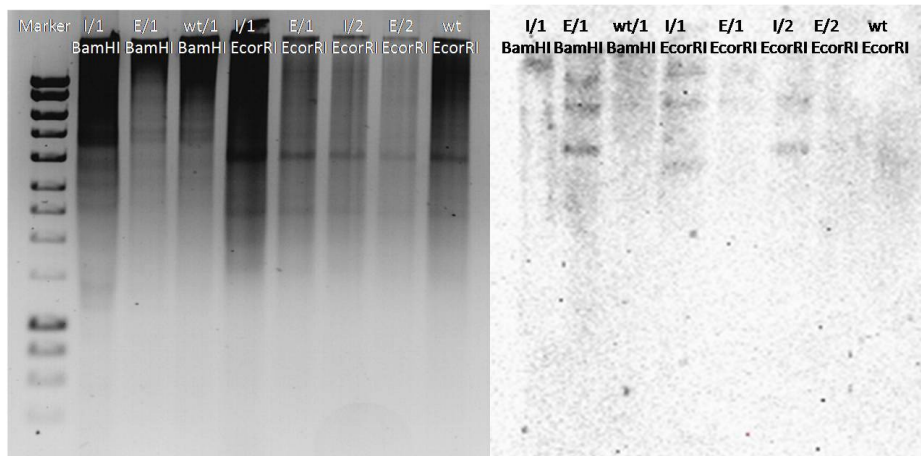


Abbildung 27: (A) Restriktionsabbau mit BamHI und EcoRV von genomischer DNA aus N516617 und N517916 (B) Southern Blot; I= Intron-Linie 516617; E= Exon-Linie 517916; wt= Wildtyp *A. thaliana* var. Col.; BamHI und EcoRI: Enzyme mit denen die genomische DNA geschnitten wurde.

Zusammenfassend liegt die Insertion in der Linie N516617 im Intron 3 und es liegt mehr als eine T-DNA-Insertion vor. In der Linie N517916 liegt die Insertion in Exon 5 und es gibt drei T-DNA-Insertionen. Zudem ist die T-DNA-Insertion im *AtNIP1;1*-Gen in dieser Linie heterozygot.

Dies bedeutet, dass bei beiden Linien Kreuzungen mit Wildtyp-Pflanzen durchgeführt werden müssen, um die überzähligen Insertionen auszukreuzen. Um mit der Linie N517916 weiterarbeiten zu können, müssen zudem homozygote Pflanzen durch Selbstbefruchtung hergestellt werden, bevor es bei dieser Linie sinnvoll ist, die Auswirkung der Insertion auf die Transkription von *AtNIP1;1* zu betrachten. Um von jeder Linie Pflanzen mit jeweils nur einer Insertion im Gen *AtNIP1;1* zu erhalten, sind mindestens zwei Kreuzungen mit Wildtypen erforderlich. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit zeitlich nicht möglich, dies zu erreichen. Somit konnten keine physiologischen Untersuchungen mit den beiden T-DNA-Insertionslinien vorgenommen werden.

3. Diskussion

3.1 Untersuchung der Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1

Die Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1 wurde im heterologen Hefexpressionssystem untersucht. Die Expression von AtNIP1;1 erhöhte die Wasserpermeabilität der Hefemembran deutlich um den Faktor 3, was gut mit den Ergebnissen von Weig et al. (1997) übereinstimmt, der im heterologen *Xenopus laevis*-Oozytensystem eine etwa 6-fache Erhöhung der Wasserpermeabilität der Membran durch die Expression von AtNIP1;1 berichtete. Der beobachtete Unterschied könnte auf die unterschiedlichen Systeme und auf unterschiedliche Einbauraten von AtNIP1;1 in die jeweilige Membran zurückzuführen sein.

Aquaporine können als Enzyme betrachtet werden, die den Transport von Wasser über eine biologische Membran erleichtern. Enzyme erniedrigen die Aktivierungsenergie einer Reaktion, was sich in einer geringen Temperaturabhängigkeit dieser Reaktion ausdrückt. In dieser Arbeit wurde die Aktivierungsenergie für den Wassertransport über die Hefemembran in Abhängigkeit der AtNIP1;1-Expression betrachtet. Dabei zeigte sich eine verringerte Aktivierungsenergie, wenn AtNIP1;1 exprimiert wurde. Dies spricht dafür, dass in AtNIP1;1 exprimierenden Hefezellen die erhöhte Wasserpermeabilität durch ein Protein (AtNIP1;1) vermittelt wird und nicht auf unspezifische Nebeneffekte zurückzuführen ist.

Die in dieser Arbeit gemessene Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1 ist moderat und stimmt mit der vermuteten generell eher geringen bis moderaten Wasserleitfähigkeit von Mitgliedern der NIP-Unterfamilie I überein (Wallace et al., 2005).

3.2 Untersuchung der Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1

In Experimenten an Symbiosomenmembranen konnte gezeigt werden, dass Nodulin 26 aus der Sojabohne eine Ammoniakleitfähigkeit aufweist, die durch Quecksilberchlorid inhibiert werden kann (Niemitz & Tyerman, 2000). Aufgrund der allgemeinen Sequenzähnlichkeit von AtNIP1;1 und Nodulin 26, sowie der identischen Aminosäurezusammensetzungen in den Selektivitätsfiltern könnte man vermuten, dass AtNIP1;1 ebenfalls für Ammoniak leitfähig sein könnte.

Im Hefesystem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch AtNIP1;1 leitfähig für Ammoniak ist. Da die Expression von AtNIP1;1 nicht nur die Ammoniakpermeabilität der Hefemembran erhöhte, sondern auch die Aktivierungsenergie für diesen Prozess verringerte, kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Erhöhung tatsächlich auf die Aktivität des AtNIP1;1-Proteins zurückzuführen ist.

Die Frage, ob AtNIP1;1 Ammoniak oder Ammonium leitet, kann mit Hilfe von Ammoniakpermeabilitätsmessungen bei verschiedenen pH-Werten geklärt werden. In einem Puffer mit einem höherem pH-Wert steigt die Konzentration von Ammoniak, während die Konzentration von Ammonium abfällt. Da in den vorliegenden Experimenten die Zugabe von Ammoniumchlorid eine Alkalinisierung des Zytosols der Hefezellen bewirkte und diese pH-Änderung mit steigendem externen pH-Wert schneller vonstatten ging, kann davon ausgegangen werden dass Ammoniak und nicht Ammonium die transportierte Stickstoffverbindung ist.

Im heterologen System konnte sowohl eine Wasser- als auch eine Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse können jedoch nicht direkt auf die Pflanze übertragen werden. Um Aussagen über die Wasser- und Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1 treffen zu können, sind Untersuchungen im homologen System notwendig.

3.3 Zwei Substrate – zwei Transportwege?

Das Ergebnis, dass AtNIP1;1 sowohl einen Transportweg für Wasser als auch einen Transportweg für Ammoniak darstellt, wirft die Frage auf, ob diese beiden unterschiedlichen Substrate denselben Weg durch das Aquaporin nehmen, und ob dieser Weg die bekannte Wasserpore des Aquaporin-Monomers ist.

Dieser Frage wurde unter anderem auch in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit (Bertl & Kaldenhoff) nachgegangen. Dort wurde berichtet, dass in TaTIP2;2, einem wasser- und ammoniakleitfähigem Aquaporin aus Weizen, die Ammoniakleitfähigkeit durch Quecksilber gehemmt werden kann, nicht aber die Wasserleitfähigkeit. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte AtNIP1;1 zeigt ganz ähnliche Eigenschaften. AtNIP1;1 ist ebenfalls für Ammoniak und Wasser leitfähig, wobei auch hier die Ammoniakleitfähigkeit durch Quecksilber hemmbar ist, nicht aber die Wasserleitfähigkeit. Die unterschiedliche Quecksilberempfindlichkeit legt die

Vermutung nahe, dass Wasser und Ammoniak unterschiedliche „Wege“ im Aquaporin nehmen. Diese Interpretation wurde auch von Bertl & Kaldenhoff (2007) publiziert. Allerdings wurde in Versuchen mit dem humanen AQP1 und dem Weizen TIP2;1 gezeigt, dass Mutationen in der „Wasserpore“ auch zu Veränderungen der Ammoniakleitfähigkeit des mutierten Aquaporins führen (Holm et al., 2005; Beitz et al., 2006). Dies spricht für eine gemeinsame Wasser- und Ammoniakpore. Zudem konnte bisher für kein Aquaporin eine Quecksilbersensitivität der Wasserleitfähigkeit in dem auch in dieser Arbeit verwendeten Hefesystem gezeigt werden (Prof. Kaldenhoff, persönliche Mitteilung). Ob die in dieser Arbeit beobachtete Quecksilberunempfindlichkeit der Wasserleitfähigkeit tatsächlich eine Eigenschaft des Aquaporins ist oder systembedingte Gründe hat, könnten Versuche mit Aquaporinen, die zuvor in anderen Systemen als quecksilbersensitiv charakterisiert wurden, klären.

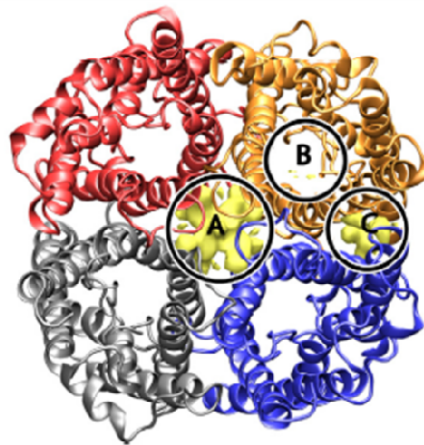


Abbildung 28: Aquaporin-Tetramer in der Aufsicht; A: Position einer möglichen zentralen „fünften“ Pore; B: Pore des Monomers; C: Position einer möglichen „Seitenpore“ (Abbildung aus Wang et al., 2007).

Unabhängig vom Einfluss des Systems bleibt eine unterschiedliche Quecksilbersensitivität von Wasser- und Ammoniakleitfähigkeit. Unter der berechtigten Annahme, dass die Quecksilberinhibierung auf eine Blockierung der Pore zurückzuführen ist, stellt sich die Frage, welchen Weg Ammoniak durch das Protein nehmen könnte. Da Wasser durch die funktionelle Pore des Aquaporin-Monomers transportiert wird (Murata et al., 2000), könnte Ammoniak den Weg durch die zentrale „fünfte“ Pore nehmen, die sich durch die Zusammenlagerung der Aquaporin-Monomere zu Tetrameren bildet (Abb. 28). In dieser Form liegen Aquaporine grundsätzlich in der Membran vor. Zugleich wird derzeit aber auch die

Möglichkeit des Substrattransports durch Seitenporen, die sich zwischen zwei Aquaporin-Monomeren bilden, diskutiert (Wang et al., 2007).

3.4 Expression und Lokalisation von AtNIP1;1

Um mit Hilfe der Ergebnisse aus dem heterologen Expressionssystem Rückschlüsse auf mögliche Funktionen von AtNIP1;1 in der Pflanze ziehen zu können, wurde die Expression und die Lokalisation des Aquaporins betrachtet.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass AtNIP1;1 in der Plasmamembran der Pflanzenzellen lokalisiert ist. Hier wäre zusätzlich zu dem Experiment mit den Zwiebelzellen eine Untersuchung der Expression der AtNIP1;1/mGFP4-Fusion in *A. thaliana* von Interesse. Dies könnte zum Beispiel in Arabidopsis-Protoplasten oder mit Hilfe von stabil mit einer AtNIP1;1/GFP-Fusion transformierten Pflanzen geschehen. So könnte man abschließend feststellen, ob AtNIP1;1 auch in *A. thaliana* in der Plasmamembran lokalisiert ist.

Die ausgewerteten Microarray-Daten zeigten die höchste Expression von AtNIP1;1 in den Wurzeln von *A. thaliana*. Lediglich in den Samen ist eine ebenfalls eine erhöhte Expression nachzuweisen. Die Expression des wasser- und ammoniakleitfähigen AtNIP1;1 in den Wurzeln ist ein Hinweis auf eine Beteiligung des Aquaporins an den Wasser- und Stickstoffaufnahme Prozessen der Pflanze.

Mit Hilfe einer GUS/AtNIP1;1-Promotor-Fusion konnte der Ort der Expression in der Wurzel und im Blatt von *A. thaliana* ermittelt werden. Der Promotor zeigt seine höchste Aktivität im Bereich der vaskulären Leitgefäße der Wurzel, aber auch eine Aktivität in den Leitbahnen der Blätter. Die nach den vorherigen Ergebnissen überraschende Reporter-gen-Aktivität in den Blättern könnte mit der hohen Sensitivität der GUS-Untersuchungen erklärt werden. Da NIP- im Vergleich zu TIP- und PIP-Aquaporinen generell in geringem Maße exprimiert werden (Alexandersson et al., 2005), waren die Microarray-Untersuchungen möglicherweise eine nicht ausreichend sensitive Methode.

3.5 Physiologische Funktionen von AtNIP1;1 in der Pflanze

3.5.1 Mögliche Funktion aufgrund der Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1

Die Ergebnisse in dieser Arbeit sprechen für eine Rolle von AtNIP1;1 in der Regulation des Wasserhaushaltes der Pflanze. Bei osmotischem Stress und bei Salzstress zeigte sich eine eindeutige Verringerung der Expression von AtNIP1;1. Eine Erniedrigung der Aquaporin-Expression bei solchen Stress-Bedingungen konnte bereits für andere Aquaporine gezeigt werden (Maurel et. al., 2000; Vera-Estrella et al., 2004; Boursiac et al., 2005). Vermutlich ist dies eine Reaktion der Pflanze, um den Wasserverlust zu minimieren. Es muss hierbei in Betracht gezogen werden, dass AtNIP1;1 im Vergleich mit vielen anderen pflanzlichen Aquaporinen, z.B. aus der TIP- oder PIP2-Familie eine sehr viel geringere Wasserleitfähigkeit aufweist und zudem in geringerem Maße exprimiert wird. Somit liegt unter Umständen ein eher geringer Einfluss auf die hydraulische Leitfähigkeit der Wurzel vor.

AtNIP1;1 konnte in einem Hefekomplementationsversuch zusätzlich als glyzerinleitfähig charakterisiert werden (Weig et al., 2000). Die genaue Funktion und Bedeutung von Glyzerin für den pflanzlichen Stoffwechsel ist noch ungeklärt. Jedoch könnte die Leitfähigkeit für Glyzerin neben der Leitfähigkeit für Wasser bei osmotischem Stress ebenfalls eine Rolle spielen, da für Glyzerin eine Bedeutung als Osmoregulator vermutet wird (Brown, 1978). Dafür, dass diese Bedeutung auch in Pflanzen gegeben ist, sprechen Ergebnisse, nach denen eine Überexpression von AtGpp2, einer in den *A. thaliana* Glyzerin-Metabolismus involvierten DL-Glyzerin-Phosphatase, zu einer deutlich erhöhten Resistenz der Pflanze gegen Salz-, osmotischen und oxidativen Stress führt (Caparrós-Martín et al., 2007). Somit ist es auch denkbar, dass die Transkription von AtNIP1;1 unter diesen Stressbedingungen aufgrund seiner Glyzerinleitfähigkeit reguliert wird.

3.5.2 Mögliche Funktion aufgrund der Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1

Der Hauptfokus dieser Arbeit lag auf der möglichen Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1 und der Bedeutung dieser Funktion für die Pflanze. Die gezeigte Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1 im heterologen System, sowie seine Lokalisation spricht für eine Beteiligung an den Stickstoffassimilationsprozessen der Pflanze. Eine zentrale Frage war, ob AtNIP1;1 möglicherweise Bestandteil des „low-affinity“-Ammoniumtransporter-System ist (der Ausdruck Ammonium kann im Folgenden

sowohl für NH_3 als auch für NH_4^+ stehen, da häufig unklar ist, welche dieser Verbindungen tatsächlich transportiert wird/vorliegt. So es sich eindeutig um NH_3 handelt, wird von Ammoniak gesprochen). Das „low-affinity“-Ammoniumtransporter-System ist im Gegensatz zu den Transportern des „high-affinity“-Ammoniumtransporter-Systems erst bei einer erhöhten Ammoniumkonzentration von Bedeutung und zeigt mit steigender Konzentration eine lineare Erhöhung der Ammoniumaufnahme (Ullrich et al., 1984, Wang et al., 1993). Im Prinzip würde das ammoniakleitfähige Aquaporin AtNIP1;1 den Anforderungen an einen „low-affinity“-Ammonium-Transporter entsprechen. Allerdings zeigt die Lokalisation von AtNIP1;1 in den Leitgefäßen der Wurzel, dass es nicht direkt an der Aufnahme von Ammonium aus dem Boden beteiligt ist, sondern eher bei der Translokation innerhalb der Pflanze von Bedeutung sein könnte.

Betrachtet man die übereinstimmende Lokalisation der Expression von AtNIP1;1 in den vaskulären Leitgefäßen mit der unter anderem ebenfalls dort stattfindenden Expression der Glutaminsynthetasen des GS1-Typs in *A. thaliana* (Ishiyama et al., 2004), wäre es denkbar, dass AtNIP1;1 in diesem Bereich Ammoniak zu den Orten des ersten Schrittes des GS-GOGAT-Zyklus leitet. An dessen Ende steht der Einbau des Stickstoffs in Aminosäuren. Interessanterweise scheint das AtNIP1;1-Homolog Nodulin 26 aus der Sojabohne eine Interaktionsstelle für eine Glutaminsynthetase in der zytosolischen C-terminalen Domäne zu besitzen (Wallace et al., 2006). Aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmungen von AtNIP1;1 und Nodulin 26 in diesem Bereich wäre es denkbar, dass auch AtNIP1;1 eine ähnliche Interaktionsstelle besitzt. So könnte das geleitete Ammoniak direkt in Glutamin umgesetzt werden, womit toxische Effekte des Ammoniaks für die Pflanze vermieden werden würden.

Es gibt Untersuchungen an Rapspflanzen, bei denen nach der Gabe von Ammonium als Hauptstickstoffquelle hohe Ammoniumkonzentrationen im Xylem gefunden wurden (Finnemann & Schjoerring, 1999). AtNIP1;1 könnte unter solchen Bedingungen eine Rolle in der Beladung des Xylems mit Ammonium spielen.

Für eine Beteiligung von AtNIP1;1 im Stickstoffmetabolismus der Pflanze spricht die Abhängigkeit der Transkription des Aquaporins von der Nitratkonzentration. Bei Nitratmangel wird die Transkription deutlich erhöht und bei Verfügbarkeit von ausreichend Nitrat sinkt die Expression langsam auf das Ursprungsniveau zurück. Es ist

daher denkbar, dass bei einem Mangel an Nitrat eine steigende Notwendigkeit der Translokation von Ammoniak durch AtNIP1;1 vorliegt.

Durch die ebenfalls vorhandene Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1 wäre hier aber auch ein Einfluss von Nebeneffekten denkbar. So ist bekannt, dass sich bei Nitratmangel die hydraulische Leitfähigkeit der Wurzel ändert (Carvajal et al., 1996, Clarkson et al., 2000, Gloser et al. 2007). Allerdings sinkt diese bei Nitratmangel, somit läuft die steigende AtNIP1;1-Expression unter diesen Bedingungen dem entgegen. Der Effekt des Nitratmangels wurde, um Rückschlüsse auf Nebeneffekte zu ziehen, auch für andere Aquaporine betrachtet, darunter für ammoniakleitfähige TIPs (Daten nicht gezeigt). Keines der Aquaporine zeigte einen Anstieg der Expression unter Nitratmangel, so zeigte z. B. AtTIP2;1 eine starke Erhöhung der Expression, nachdem Nitratmangelpflanzen Nitrat gegeben wurde.

Interessant ist auch die Expression von AtNIP1;1 in den Samen von *A. thaliana*. Zum einen könnte die Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1 für die Quellung des Samens von Bedeutung sein und zum anderen findet dort gerade dann, wenn die Keimung eingeleitet wird, ein hoher Nährstoffaustausch statt. Aus diesem Grund ist auch hier die Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1 von besonderem Interesse.

3.6 Ausblick

Um die tatsächliche physiologische Bedeutung der Wasser- und Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1 zu ermitteln, sind Untersuchungen im homologen System notwendig. Hierfür sollten die Möglichkeiten, die Pflanzen mit verringerter oder nicht vorhandener AtNIP1;1-Expression bieten, genutzt werden. Diese könnten mit den T-DNA-Insertionslinien nach der Auskreuzung der zusätzlichen Insertionen zur Verfügung stehen. Ein erster Schritt, um zu ermitteln, ob im natürlichen System auch eine Leitfähigkeit für Wasser oder Ammoniak vorliegt, bzw. um herauszufinden, ob AtNIP1;1 in einem solchen Maße leitfähig ist, dass es auch einen tatsächlichen Einfluss auf die Permeabilität der pflanzlichen Plasmamembran hat, wäre die Isolation von Plasmamembranvesikeln aus Pflanzen mit natürlicher und Pflanzen mit verringerter AtNIP1;1-Expression. Diese könnten im Anschluss, in einem zu den Versuchen im heterologen Hefesystem entsprechenden Experiment, mit Hilfe der „Stopped-Flow“-Spektrophotometrie auf ihre Wasser- und Ammoniakpermeabilität untersucht werden. Unterschiede im Vergleich der Wasser- bzw.

Ammoniakpermeabilität der Plasmamembran von Pflanzen mit normaler und Pflanzen mit erniedrigter AtNIP1;1-Expression könnten so auf AtNIP1;1 zurückgeführt werden. Dies wäre eine Möglichkeit die Leitfähigkeit für beide Moleküle im homologen System zu belegen.

Darüberhinaus sollte eine komplette phänotypische Analyse der Pflanzen der T-DNA-Insertionslinien durchgeführt werden, um den Einfluss von AtNIP1;1 auf den Phänotyp aller Organe und Entwicklungsstadien zu untersuchen. Interessant wäre hier auch eine Untersuchung des Einflusses der AtNIP1;1-Expression auf die Keimungsgeschwindigkeit, da AtNIP1;1 auch in den Samen in erhöhtem Maße exprimiert wird.

Mit den Pflanzen der T-DNA-Insertionslinien könnte für die Ermittlung der physiologischen Relevanz der Wasser- und Ammoniakleitfähigkeit eine Vielzahl weiterer Experimente durchgeführt werden. Möglichkeiten einer Charakterisierung dieser Linien würden z.B. Messungen der hydraulischen Leitfähigkeit der Wurzel bieten, um auf diesem Weg weitere Informationen über die physiologische Bedeutung des wasserleitfähigen AtNIP1;1 zu erlangen.

Ebenfalls von Interesse wären, im Bezug auf die Ammoniakleitfähigkeit des Aquaporins, Aufnahmeexperimente mit radioaktiv markiertem Stickstoff, um zu ermitteln, ob AtNIP1;1 hierauf einen Einfluss hat. Desweiteren könnten die Pflanzen auf verschiedenen Stickstoffquellen und bei verschiedenen Stickstoffkonzentrationen angezogen werden, um die phänotypischen Auswirkungen zu betrachten.

Einen ähnlichen experimentellen Ansatz könnte man für die Wasserleitfähigkeit planen und die Pflanzen bei verschiedenen Stressbedingungen untersuchen, da eine physiologische Bedeutung des Aquaporins möglicherweise erst unter bestimmten Stressbedingungen zum Tragen kommt.

4. Material und Methoden

4.1 Kultivierung der Pflanzen und Probennahme

4.1.1 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Die *Arabidopsis thaliana*-Samen wurden entweder auf Murashige-Skoog (MS)-Agarplatten oder in einem Erde/Sand-Gemisch (Verhältnis 2:1) ausgesät. Nach einer zweitägigen Vernalisation bei 4 °C in der Kühlkammer, wurden die Samen zur Keimung in eine klimatisierte Anzuchtkammer gebracht. Der Tag-/Nachtrhythmus betrug 8/16 h bei Temperaturen von ca. 24 °C am Tag und 20 °C in der Nacht. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 70 % und die Lichtintensität zwischen 70-100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Für die Anzucht auf MS-Medium mussten die Samen zunächst sterilisiert werden, um Verpilzungen der Agarplatten zu vermeiden. Dafür wurden die Samen für zwei Minuten in 70 % EtOH gewaschen und anschließend in einer Sterilisierungslösung für fünf Minuten sterilisiert. Danach erfolgten fünf einminütige Waschschriffe mit sterilem Wasser. Mit Hilfe eines Zahnstochers oder einer gelben Pipettenspitze wurden die Samen auf das MS-Medium transferiert. Alle Arbeiten erfolgten unter der Sterilbank.

Sterilisierungslösung: 5 % Hypochlorid
 0.02 % Triton-X 100
 ad H₂O (steril) to VE

MS-Medium (1 l): 4.3 g MS-Salze
 10 g Pflanzenagar
 pH 5.7 mit verdünnter KOH

Die Samen der T-DNA-Insertionslinien wurden beim Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, Nottingham) bestellt und stammten von Pflanzen der F3-Generation, deren Elternpflanzen mittels *Agrobacterium tumefaciens* mit T-DNA transformiert und über Selbstbefruchtung vermehrt wurden. Es handelte sich bei den Mutationen um eine Insertion der T-DNA nach dem Basenpaar 1270 im Intron 3 (N516617) und um

eine Insertion bei Basenpaar 1623 im Exon 5 (N517916) der genomischen Sequenz von AtNIP1;1.

4.1.2 Probennahme an *Arabidopsis thaliana*

Für analytische Zwecke wurden junge Blätter mit einer Schere abgeschnitten, in ein 1.5 ml Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Alternativ wurden 2 bis 3 Wochen alte, komplette Pflanzen verwendet. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

4.2 Vorgehensweise mit Bakterien

4.2.1 Verfahren mit *Escherichia coli*

Für eine Über-Nacht-Kultur wurden *E. coli*-Bakterien mit Hilfe eines Zahnstochers entweder von einer Agar-Platte oder aus einer Glycerin-Kultur in ein Kulturröhrchen mit 3 ml LB-Medium überimpft, dem gegebenenfalls das entsprechende Antibiotikum zur Selektion zugegeben wurde. Die Kulturen wurden über Nacht in einem Schüttler bei 37 °C und ca. 250 rpm inkubiert.

In einigen Fällen wurde die Kultur am folgenden Tag für die Herstellung einer Glycerinkultur verwendet. Zu diesem Zweck wurden ca. 500 µl Kultur in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und Glycerin (Endkonzentration 25 %) zugegeben. Die Bakterien-Kulturen wurden zunächst in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80 °C eingefroren. Über-Nacht-Kulturen wurden in der Regel für die Plasmidisolation verwendet.

LB-Medium nach Luria-Bertani:

- 10.0 g NaCl
- 5.0 g Hefe-Extrakt
- 10.0 g Trypton
- ad 1 l bidest. Wasser, pH 7.5

Das Medium wurde vor Verwendung autoklaviert, und nach dem Abkühlen wurden entsprechende Antibiotika zugesetzt. Im Normalfall waren dies 50 µg/ml Ampicillin oder 100 µg/ml Kanamycin.

4.2.2 Herstellen kompetenter E. coli-Zellen

Für die Herstellung kompetenter E. coli-Zellen wurden 50 ml LB-Medium mit 1 ml aus einer frischen E. coli-Über-Nacht-Kultur angeimpft. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 180 rpm bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0.5-0.6 kultiviert. Danach erfolgte eine Inkubation für 10 min auf Eis. Die Zellen wurden in SS-34 Zentrifugenröhrchen bei 4.000 rpm für 10 min bei 4 °C in einem SS34-Rotor in einer Sorvall-Zentrifuge (RC5C Sorvall Instruments Du Pont) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 10 ml eisgekühlter 0,1 M CaCl₂-Lösung vollständig durch Schütteln resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert und das Sediment in 2 ml eisgekühlter 0.1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Daraufhin wurden 1 ml einer Glycerinlösung (Glycerin (90%)/0.1 M CaCl₂) hinzugegeben und durchmischt. Je 200 µl wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2.3 Hitzeschock-Transformation von E. coli

Zur Transformation wurden die E. coli-Stämme XL1blue (Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI q ΔM15 Tn10 (Tet^r)]), DH5α (Genotyp: F- deoR recA1 endA1 hsdR1(r_k - m_k +) supE44 1-thi gyrA96 relA1) und DB3.1 (Genotyp: F- gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) supE44 ara14 galk2 lacY1proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mtl1) verwendet.

Die kompetenten Zellen waren bei -80 °C eingefroren und wurden vor Beginn der Transformation auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden 50 – 100 ng Plasmid eines Ligationsansatzes mit 50 - 100 µl kompetenter Zellen vorsichtig vermischt und für 20 min auf Eis belassen. Nach einer kurzzeitigen Hitzeschockbehandlung der Zellen (45 s bei 42 °C) wurden sie für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen mit 250 µl SOC-Medium bei 37 °C für 1 h mit 225 rpm geschüttelt, bis sie auf LB-Agar-Platten, die ein entsprechendes Antibiotikum enthielten, ausgestrichen wurden. Für eine Blau-Weiß Selektion nach einer T/A-Klonierung wurde den Platten zusätzlich IPTG (60 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml) zugesetzt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und transformierte Bakterien durch die entsprechende Resistenz bzw. durch die Blau-/Weißfärbung selektiert.

SOC-Medium: 2 % Trypton
 0.5 % Hefeextrakt
 10 mM NaCl

	2.5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose
	pH 7.0
LB-Nähragar:	1 % NaCl
	1 % Trypton
	0.5 % Hefeextrakt
	1.5 % Agar

Die weißen Kolonien dienten zur Plasmidisolierung, indem jeweils eine Übernachtskultur angezogen und diese wie beschrieben behandelt wurde. Nachfolgend wurde das Plasmid durch Restriktionsspaltung und elektrophoretische Auftrennung charakterisiert.

4.2.4 Verfahren mit *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens wurde auf die gleiche Weise kultiviert wie *E. coli*, allerdings betrug die Inkubationstemperatur 28 °C. Es wurde der Agrobakterienstamm GV3101 verwendet (Genotyp: PM90RK, Gm^R, Rif^R). Für die Transformation von *A. thaliana* mittels der „Floral-Dip“-Methode wurden die Bakterien in YEP-Medium angezogen. In diesem Medium wird eine höhere Dichte der Agrobakterien erreicht.

YEP-Medium:	1 % Hefeextrakt
	1 % Bacto-Peptone
	0.5 % NaCl
	pH 7.0

4.2.5 Herstellen kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

50 ml LB-Medium wurden mit 1 ml aus einer *A. tumefaciens*-Über-Nacht-Kultur angeimpft und bei 28 °C und 225 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5-0.8 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min im Eisbad inkubiert. Die Zellen wurden in SS-34 Zentrifugenröhrchen bei 4.000 rpm für 10 min bei 4 °C in einem SS34-Rotor in einer Sorvall-Zentrifuge (RC5C Sorvall Instruments Du Pont) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 10 ml eisgekühltem 20 mM

CaCl₂ resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert (4000 rpm, 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml 20 mM CaCl₂ resuspendiert. Die kompetenten Agrobakterien wurden in 100 µl Portionen aliquotiert und konnten bei -80°C für maximal zwei Wochen gelagert werden.

4.2.6 Hitzeschock-Transformation von *A. tumefaciens*

Für die Transformation wurde ein Ansatz kompetenter *A. tumefaciens* aus der -80 °C Truhe entnommen, 50 – 100 ng Plasmid hinzu pipettiert, vorsichtig gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nachdem die Zellen komplett gefroren waren, wurden sie bei 37 °C für 5 min einem Hitzeschock unterzogen. Die Zellen wurden im Anschluss mit 1 ml LB Medium versetzt und für 2–4 Stunden bei 28 °C geschüttelt. Danach wurden entsprechende Mengen (50 -200 µl) auf LB-Platten mit Antibiotika zur Selektion ausgestrichen und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

4.3 Verfahren mit *Saccharomyces cerevisiae*

4.3.1 Verwendeter Stamm/Kultivierung

In dieser Arbeit wurde mit dem *Saccharomyces cerevisiae*- Stamm 31019b (MATa, *ura3*, *mep1Δ*, *mep2Δ::LEU2* *mep3Δ::kanMX2*; Marini et al., 1997) gearbeitet. Dieser Stamm zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass er Ammoniumtransporter-defizient ist.

Der Hefestamm 31019b wurde auf YPD Vollmedium mit 2% Glukose kultiviert. Dabei wurde bei der Kultivierung auf YPD-Agar-Medium ein Verdünnungsausstrich mit Hilfe einer sterilen Impföse angefertigt. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für zwei bis drei Tage im Inkubator.

Zum Ansetzen von Über-Nacht-Kulturen wurden 3 ml YPD-Flüssigmedium in einem Kulturröhrchen mit einer Hefekolonie angeimpft und bei 225 rpm und 30 °C inkubiert. Im Fall der transformierten Hefestämme wurde anstelle des YPD-Mediums SC-Selektionsmedium (-*ura*) verwendet. Nach der Transformation des Hefestamms 31019b mit dem entsprechenden Uracil-codierenden Vektor (pYES2/CT, Invitrogen) konnte die Selektion der Transformanten auf SC-Medium ohne Uracil erfolgen.

YPD-Medium: 1 % Hefeextrakt
 2 % Pepton

	2 % Glukose
	1.5 % Agar (im Fall von YPD-Agar-Medium)
SC-Medium:	0.5 % Ammoniumsulfat
	0.17 % Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren /Ammoniumsulfat
	2 % Glukose bzw. Galaktose
	1.15 g Aminosäure-Mix
	1.5 % Agar (im Fall von SC-Agar-Medium)

Die Medien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert (20 min, 121 °C).

Aminosäure-Mix:	0.01 % Adenin
	0.01 % Arginin
	0.01 % Cystein
	0.01 % Leucin
	0.01 % Lysin
	0.01 % Threonin
	0.005 % Aspartat
	0.005 % Histidin
	0.005 % Isoleucin
	0.005 % Methionin
	0.005 % Phenylalanin
	0.005 % Prolin
	0.005 % Serin
	0.005 % Tyrosin
	0.005 % Valin

4.3.2 Herstellen einer *S. cerevisiae*-Dauerkultur

Für eine Dauerkultur wurden 850 µl einer frischen Über-Nacht-Kultur in ein steriles 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, 150 µl 90 % Glycerin (Endkonzentration 15 %) hinzu gegeben, kurz gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.3.3 Transformation von *S. cerevisiae*

4.3.3.1 Biolistische Transformation von *S. cerevisiae*

Zur biolistischen Transformation von 31019b-Hefezellen wurde das „Particle-Delivery-System“ (PDS) 1000/He (Biorad) verwendet. Hierzu wurde eine Kultur des 31019b-Stammes in YPD-Medium angelegt und für 48 h bei 30 °C inkubiert. Die *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen sollten sich in der stationären Wachstumsphase befinden. Durch Zentrifugation (5min, 500xg, RT) wurden die Hefezellen geerntet, mit autoklavierten H₂O gewaschen und in 3ml autoklavierten H₂O aufgenommen. 100 µl der Hefesuspension wurden in die Mitte einer Petrischale mit SC+glu (-Ura)-Agarmedium, komplettiert mit 0,75 M Sorbitol (Applichem) und 0,75 M Mannitol (Applichem), gegeben und in einem Radius von 2 cm plattiert. Die so präparierten Hefezellen wurden nach Verflüchtigen des H₂O zur Transformation verwendet. Für die Beschichtung der Wolfram-Mikropartikel mit Plasmid-DNA und die anschließende Transformation der Hefezellen wurde nach dem Protokoll beschrieben in (Sanford et al., 1993) vorgegangen.

4.3.3.2 Herstellung kompetenter Hefezellen mit Lithiumacetat

Neben der Methode der biolistischen Transformation wurde für die Transformation von Hefen die Lithiumacetat-Methode verwendet. Dafür wurde eine 25 ml Hefekultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8-1.0 kultiviert und anschließend für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 8 ml LiAc/TE-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet in 250 µl LiAc/TE-Lösung aufgenommen und für eine Stunde bei 30°C und 75 rpm geschüttelt. Danach konnten die kompetenten Hefen entweder direkt transformiert werden oder in 0.1 M LiAc/TE-Lösung mit 15 % Glycerin aufgenommen und bei -80 °C gelagert werden.

LiAc/TE-Lösung: 100 mM Lithiumacetat

10 mM Tris/HCl

1 mM EDTA

4.3.3.3 Transformation von Hefezellen mittels Lithiumacetat-Methode

Um kompetente Hefezellen zu transformieren, wurden zu 100 µl kompetenter Hefen 50 µl Heringssperma, 1 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl) und 600 µl PEG/LiAc/TE-Lösung gegeben. Das Heringssperma wurde zuvor 10 min bei 100 °C gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Hefezellen wurden für 30 min bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Der anschließende Hitzeschock wurde bei 42 °C für 15 min durchgeführt. Danach wurden die Zellen für 3 min auf Eis gehalten. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 5000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl TE resuspendiert. Jeweils 150 µl der Hefen wurden zur Selektion auf einer SC-Platte (-ura) ausgestrichen. Die Hefen wurden für drei bis vier Tage bei 30 °C inkubiert.

PEG/LiAc/TE-Lösung (10ml): 8 ml 50% PEG
 1 ml 10 M LiAc
 1 ml 10 M TE

4.3.4 Isolation der Plasmid-DNA aus Hefezellen

Die Methode beruht auf der klassischen Phenol-Chloroform-Extraktion, bei der sich die Nukleinsäuren in der oberen, wässrigen Phase anreichern, während Proteine denaturiert werden und sich in der unteren organischen bzw. in der Interphase (Grenzschicht zwischen oberer und unterer Phase) sammeln. Zusätzlich werden Säure-behandelte Glaskügelchen hinzu gegeben, um die Hefezellen mit Hilfe der Scherkräfte aufzuschließen. Durch eine anschließende Fällung mit Alkohol wurden die Phenolreste entfernt. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurde eine Hefe-Über-Nacht-Kultur angefertigt.

Je 2 ml der Kultur wurden in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 14.000 rpm 5 s in einer Tischzentrifuge (Z160M Hermle) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mittels kurzem vortexen resuspendiert. Den Zellen wurden 300 µl Extraktionspuffer, 300 µl einer Phenol- Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung und 0.3 g Säure-behandelte Glaskugeln (0.5 mm) hinzu gegeben. Danach

wurden die Proben für 5 min mit Hilfe einer Kugelmühle durchmischt. Anschließend wurde bei 10.000 rpm für 5 min zentrifugiert und die obere, wässrige Phase abgenommen. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem identischen Volumen an Isopropanol überschichtet und gemischt. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte bei -80 °C für 30 min. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm wurde der Überstand verworfen und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 20 µl bidest. H₂O aufgenommen.

Extraktionspuffer:	2 % Triton X-100
	1 % SDS
	100 mM NaCl
	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA
Phenol-Chloroform-Lösung:	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
	im Verhältnis 25:24:1

4.3.5 Induktion der Protein-Expression transformierter Hefen

Die Hefezellen wurden mit dem pYES2/CT Vektor transformiert. Dieser besitzt u.a. einen Galaktose-induzierbaren Promotor. Dementsprechend konnte die Induktion der Proteinexpression durch die Anzucht der Hefen in Medium mit Galaktose erfolgen.

Dazu wurden aus einer Einzelkolonie 20 ml SC-Medium (-ura) mit 2% Glukose angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 225 rpm kultiviert. Die Zellen wurden bei 3000 rpm und 4 °C 5 min zentrifugiert und in 10 ml sterilem Wasser aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml sterilem bidest. Wasser aufgenommen und die OD₆₀₀ bestimmt. Es wurden hieraus 20 ml SC-Medium (-ura) mit 2 % Galaktose auf eine OD₆₀₀ von 0.4 angeimpft und bis zum Zeitpunkt der optimalen Protein-Expression kultiviert.

4.3.6 Protoplastierung von Hefezellen

Für die Durchführung von Messungen der Wasserpermeabilität mit Hilfe der „Stopped-flow“-Spektrophotometrie wurden die Hefezellen zunächst nach Bertl et al.

(1998) protoplastiert. Dazu wurden 10 ml Hefekultur bei 3000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 3 ml Puffer I resuspendiert und für 15 min bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 6 ml Puffer II, sowie pro Pellet ca. 2 mg Zymolyase und 100 mg BSA. Danach wurden die Zellen erneut bei 30 °C für 45 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Protoplasten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml Puffer P III resuspendiert. Die Effizienz der Protoplastierung konnte am Mikroskop überprüft werden.

Puffer I: 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.2 mit KOH

0.2 % β -Mercaptoethanol

Puffer II: 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.2 mit KOH

2.4 M Sorbit

0.2 % β -Mercaptoethanol

Puffer III: 1.8 M Sorbit

50 mM NaCl

5 mM CaCl_2

10 mM Tris/HCl, pH 8.0

4.3.7 Beladen von Hefezellen mit Fluorescein-Bisacetat

Für Messungen der Ammoniak-Permeabilität mit Hilfe der „Stopped-Flow“-Spektrophotometrie mussten die Hefen mit Fluorescein-Bisacetat beladen werden. Dies erfolgte nach Bertl et al. (2007). Dafür wurden 10 ml Hefekultur bei 3000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Hefen wurden mit sterilem bidest. Wasser gewaschen und anschließend in 5 ml Ladepuffer aufgenommen. Danach wurden die Hefen für 20 bis 30 min bei 30 °C und 200 rpm inkubiert bis sie eine intensive Gelbfärbung aufwiesen. Danach wurden sie für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert und zweimal mit 5 ml kaltem Inkubationspuffer gewaschen. Schließlich wurden die Hefezellen in 3 ml Inkubationspuffer aufgenommen.

Ladepuffer:	50 mM HEPES, pH 7.0
	5 mM 2-deoxy-D-Glukose
	50 μ M Fluorescein-Bisacetat
Inkubationspuffer:	10 mM Tris/HCl
	50 mM NaCl
	5 mM CaCl_2
	pH 8.0

4.3.8 Quecksilberinkubation von Hefezellen

Um festzustellen, ob die Ammoniak- bzw. die Wasserleitfähigkeit von AtNIP1;1 durch Quecksilber inhibierbar ist, wurde den Hefezellen direkt vor der Messung Quecksilberchlorid zugegeben (100 bis 1000 μ M). Darin wurden sie für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor Ammoniak- bzw. Wasserpermeabilitätsmessungen am „Stopped-Flow“-Spektrophotometer durchgeführt wurden.

4.4 Verfahren mit DNA

4.4.1 Isolation von Plasmid-DNA aus E. coli mittels Plasmid-Mini-Präparation

Dem verwendeten Verfahren zur Gewinnung von Plasmid-DNA liegt ein alkalischer Aufschluss der Bakterien zugrunde. Aus dem Lysat lässt sich die bakterielle genomische DNA selektiv durch Erniedrigung des pH-Wertes ausfällen, so dass im Überstand nur die Plasmid-DNA verbleibt. Proteine werden auf diese Weise ebenfalls entfernt.

Von einer Bakterienkultur, die über Nacht in LB-Nährmedium unter Schütteln (150-200 rpm) bei 37 °C gewachsen war, wurden 1.5 ml entnommen und in einem Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur 3 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Bakterien- Pellet in 300 μ l Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 μ l Puffer P2 und unter leichtem Schwenken wurden die Zellen innerhalb von 5 min lysiert. Nach Hinzufügen von 300 μ l Puffer P3 und 15 min Inkubation auf Eis wurden genomische DNA und Proteine durch 15-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm pelletiert. Die Plasmid – DNA wurde anschließend mit 700 μ l Isopropanol aus dem Überstand sedimentiert. Um störende Salze zu entfernen, wurde das Präzipitat mit 500 μ l eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde entweder in bidest. Wasser oder TE-Puffer gelöst. Um etwaige Ethanol-Reste zu

entfernen wurde das geöffnete Eppendorf-Gefäß für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Plasmide wurden bei -20 °C aufbewahrt.

P1 (Resuspensionspuffer):	50 mM Tris/HCl pH8 10 mM EDTA 100 µg/ml RNaseA
P2 (Lysepuffer):	200 mM NaOH, 1 % SDS
P3 (Neutralisationspuffer):	3 M Kaliumacetat pH 5.5

4.4.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* mittels Plasmid-Mini-Präparation

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* erfolgte weitestgehend nach dem Protokoll für die Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli*. Dem Puffer P1 wurden zusätzlich 20 µl Lysozym (50 mg/ml) zugegeben und nach dem Resuspendieren der Zellen in P1 eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Das weitere Vorgehen entsprach der Methode der Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli* (Material und Methoden 4.4.1).

4.4.3 Isolation genomischer DNA aus *A. thaliana*

Diese Methode eignet sich gut für die Isolierung genomischer DNA, wenn man nur geringe Mengen Pflanzenmaterial zur Verfügung hat. 100 mg Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und darin gemörsert. Zu der gefrorenen Probe wurden 750 µl DNA-Extraktionspuffer und 750 µl Chloroform in 2 ml-Eppendorfgefäße zugegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Proben für 30 min bei 65 °C inkubiert und dabei von Zeit zu Zeit der Deckel geöffnet. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 7500xg. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1 Vol. Isopropanol zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurde für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach der Zentrifugation wurde das Ethanol abgenommen und das Pellet in 100 µl sterilem bidest. Wasser aufgenommen. Um RNA abzubauen wurde das Volumen zunächst mit sterilem bidest. Wasser auf 200 µl aufgefüllt und 6 µl RNase A (10mg/ml) zugegeben. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 37°C. Im Anschluss

wurden 2 Vol. 100 % Ethanol und 1/10 Vol. 3 M NaOAc zugegeben und der Ansatz für mindestens 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Die Proben wurden dann für 5 min bei max. Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde das Ethanol abgenommen, das Präzipitat in 50 µl Wasser aufgenommen und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei 4 °C.

DNA-Extraktionspuffer	1 % Sarcosyl
	0.8 M NaCl
	0.022 M EDTA
	0.22 M Tris/HCl pH 7.8
	0.8 % CTAB
	0.14 M Mannitol (oder Sorbitol)

Vor Gebrauch 14 µl 2-Mercaptoethanol pro 10 ml Puffer zugeben.

4.4.4 Isolation genomischer DNA aus *A. thaliana* (nach Dolferus, 1991)

Mit der Methode nach Dolferus (1991) kann eine für Southern Blots ausreichende Menge genomischer DNA gewonnen werden. Es wurden 0.5-2.0 Gramm Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zerkleinert und mit 15 ml Extraktionspuffer vermischt. Im Anschluss wurde 1 ml 20 % SDS zugegeben und das Homogenat wurde für 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 5 ml 5 M Kaliumacetat wurden die Proben 20 min auf 4 °C abgekühlt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 4 °C und 20000 rpm für 20 min im SS34-Rotor in einer Sorvall-Zentrifuge (RC5C Sorvall Instruments Du Pont). Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10 ml Isopropanol vermischt. Die Fällung erfolgte für mindestens 30 min bei -20 °C. Danach erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10000 rpm im SS34-Rotor. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 850 µl T₅₀E₁₀ resuspendiert. Es wurden 10 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben und die Proben wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde 1 Vol. 1:1 Phenol/Chloroform zugegeben und 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und erneut mit 1 Vol. 1:1 Phenol/Chloroform versetzt. Die Zentrifugation erfolgte bei 10000 rpm für 10 Minuten. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0.2 Vol. 3 M Natriumacetat und 0.6 Vol. Isopropanol versetzt. Die Fällung erfolgte über mindestens 2 Stunden (bis zu über

Nacht) bei -20 °C. Anschließend wurde für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 100 ml TE-Puffer aufgenommen und die Probe bei 37 °C für 5 Minuten inkubiert, um Ethanol-Reste vollständig zu entfernen. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei 4 °C.

DNA-Extraktionspuffer:	100 mM Tris/HCl pH 8.0 50 mM EDTA 500 mM NaCl 10 mM Mercaptoethanol (direkt vor Gebrauch zugeben)
T ₅₀ E10:	50 mM Tris/HCl pH 8.0 10 mM EDTA pH 8.0
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8.0 1 mM EDTA pH 8.0

4.4.5 Restriktionsabbau von DNA

Sowohl für die Charakterisierung, als auch für weitere Manipulationen der DNA, z.B. das Einbringen der cDNA in einen anderen Vektor, war es notwendig die Plasmid-DNA mittels spezifischer Restriktionsenzyme zu spalten. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Empfehlungen der Hersteller (Gibco BRL, MBI Fermentas) gewählt. In einem Reaktionsansatz wurden pro µg DNA 2 Einheiten (U) Enzym eingesetzt, um einen vollständigen Abbau der DNA zu gewährleisten. Die Reaktion wurde für mindestens 1 h bis zu über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Ergebnis der Spaltung wurde durch Elektrophorese überprüft.

4.4.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in einem Agarosegel

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte in Abhängigkeit von der Fragmentlänge in Agarosegelen (ICN) unterschiedlicher Konzentration. Für Standardgele betrug diese 1%. Als Puffersystem fungierte 1x TAE. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 5-10 Volt/cm durchgeführt. Zum Vergleich der Molekülgrößen wurde parallel ein Standard mit Fragmenten definierter Größe (1 kb DNA-Leiter, Gibco BRL) aufgetrennt. Der Nachweis der DNA war durch

die Fluoreszenz des im Gel enthaltenen DNA-interkalierenden Ethidiumbromids (0.05 µg/ml) unter UV-Licht möglich (ImageMaster, Pharmacia Biotech).

50 x TAE-Puffer:

- 242 g Tris, pH 8.0
- 57.1 ml Essigsäure (99 %)
- 100 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0

4.4.7 Elution von DNA aus einem Agarosegel

Durch Einlagerung von Ethidiumbromid im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemachte DNA-Banden wurden mitsamt der Agarose aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolation der DNA aus dem Gel wurden das QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden) oder das NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet und die einzelnen Schritte entsprechend der Anweisungen der Hersteller durchgeführt. Die Effizienz der Elution wurde durch erneute Auftrennung eines Anteils der gewonnenen DNA überprüft.

4.4.8 Sequenzieren von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Kettenabbruchmethode bei der Firma SEQLAB (Göttingen). Bei Präparation der DNA und der Zugabe der benötigten Primer wurde nach den Anweisungen von SEQLAB vorgegangen.

4.4.9 Bedingungen für die Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, vom engl.: polymerase chain reaction) dient der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Dabei wird eine DNA-Matrize mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase in vitro repliziert. Als Matrize konnte dabei ein Plasmid, genomische DNA oder auch eine Bakterienkolonie dienen.

Standard-PCR-Ansatz (25 µl):	2.5 µl Biotherm PCR-Puffer (10 x)
	1 µl MgCl ₂ (2.5 µM)
	0.5 µl dNTP-Mix (10 mM)
	0.5 µl Primer FW (10 µM)
	0.5 µl Primer REV (10 µM)
	0.5 µl Biotherm Taq-Polymerase (1U/µl)
	Template

ad 20 µl mit bidest. Wasser

Das Standard PCR Programm sah wie folgt aus:

Startdenaturierung:	95 °C	2 min
Zyklen:		
Denaturierung:	95 °C	20 s
Primer Anlagerung:	$T_m - 4\text{ °C}$	20 s
Elongation:	72 °C	1 min pro 1000 bps
Endsynthese:	72 °C	3 min

4.4.10 TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced PCR)

Die Methode der TAIL-PCR kann zur Identifizierung von unbekannten Gen-Sequenzen, die an eine bekannte Gensequenz angrenzen, benutzt werden. So ist es mit dieser Methode möglich, herauszufinden, in welchem Gen von *A. thaliana* T-DNA mittels *A. tumefaciens* inseriert wurde.

Hierfür werden in drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen drei spezifische „nested“-PCR-Primer (LBa1, LBc1 und LBb1), die an der bekannten T-DNA-Sequenz anlagern und eine Mischung degenerierter Primer (AD1, AD2, AD3) benutzt. Mit diesen Primer-Kombinationen kann man die Amplifikation spezifischer und unspezifischer PCR-Produkte über die Wahl der PCR-Bedingungen kontrollieren. Dies geschieht durch die Anwendung eine Mischung von Zyklen mit hoher und niedriger Stringenz. Das Prinzip ist schematisch in Abbildung 29 dargestellt. Es wurde das Protokoll von Liu et al. (1995) befolgt. Mit jeder PCR steigt die Ausbeute spezifischer Produkte, während die Menge an unspezifischen Produkten abnimmt. Nach der tertiären PCR können die spezifischen PCR-Produkte zur Sequenzierung gegeben werden.

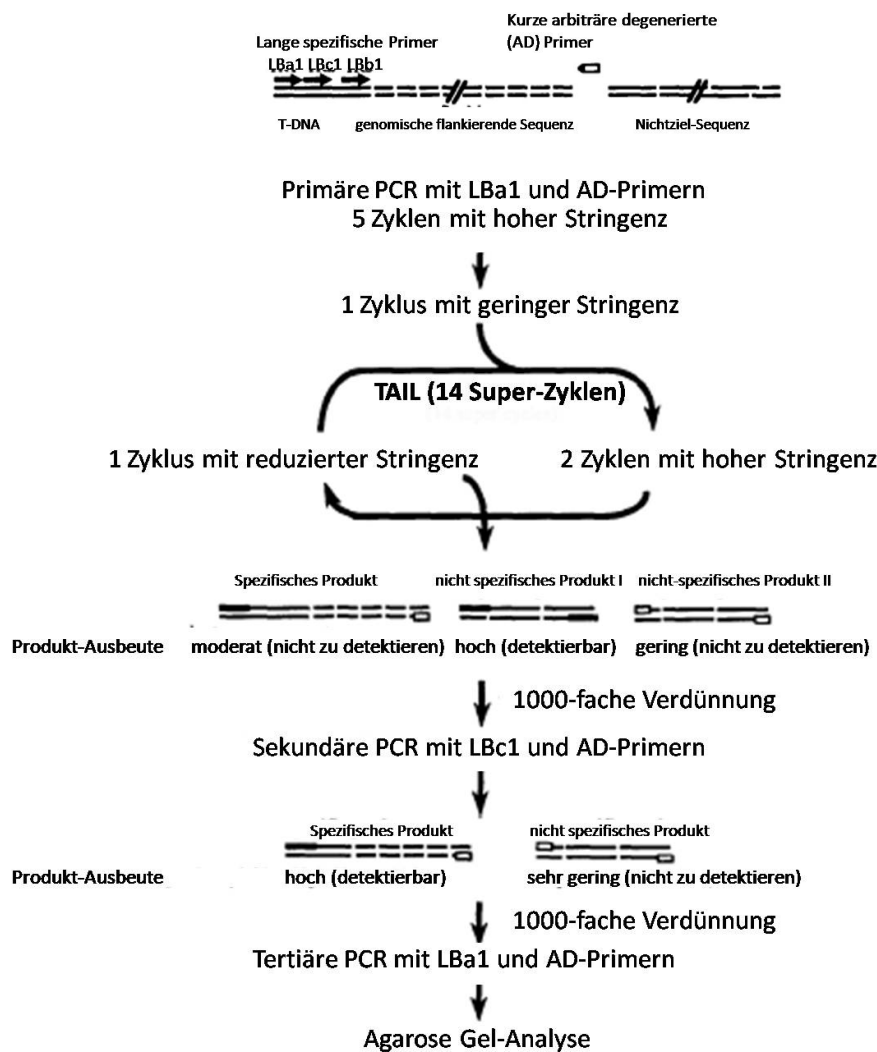


Abbildung 29: Schema der TAIL-PCR für die spezifische Amplifikation der genomischen, flankierenden Sequenz einer T-DNA-Insertion (verändert nach: Liu et al., 1995).

Ansatz primäre TAIL-PCR:

20 ng genom. DNA
 2 µl 10x Puffer
 1.6 µl dNTPs (10 mM)
 0.4 µl LBa1 (10 µM)
 2 µl AD1 (20 µM)
 3 µl AD2 (20 µM)
 4 µl AD3 (20 µM)
 1 U Taq Polymerase
 ad 20 µl Wasser

Programm primäre TAIL-PCR :

1 93 °C 1'
 2 95 °C 1'
 3 94 °C 30 s

Zyklen

1-2 x1

4	62 °C 1'		
5	72 °C 2' 30 s	3-5	x5
6	94 °C 30 s		
7	25 °C 3' → Rampe zu 72° C innerhalb der nächsten 3'		
8	72 °C 3'	6-8	x1
9	94 °C 10 s		
10	68 °C 1'		
11	72 °C 2' 30 s		
12	94 °C 10 s		
13	68 °C 1'		
14	72 °C 2' 30 s		
15	94 °C 10 s		
16	44 °C 1'		
17	72 °C 2' 30 s	9-17	x12
18	72 °C 5'	18	x1

Ansatz sekundäre TAIL-PCR:

- 1 µl 1:50 verdünntes primäres PCR-Produkt
- 2 µl 10x PCR-Puffer
- 1.6 µl dNTPs (10 mM)
- 0.4 µl Lbc1 (10 µM)
- 1.5 µl AD1 (20 µM)
- 2 µl AD2 (20 µM)
- 2.2 µl AD3 (20 µM)
- 1U Taq Polymerase
- ad 20 µl Wasser

Programm sekundäre TAIL-PCR:	Zyklen
1 94 °C 3'	
2 94 °C 10 s	
3 64 °C 1'	
4 72 °C 2' 30 s	
5 94 °C 10 s	
6 64 °C 1'	
7 72 °C 2' 30 s	
8 94 °C 10 s	
9 64 °C 1'	
10 72 °C 2' 30 s	
11 94 °C 10 s	
12 44 °C 1'	
13 72 °C 2' 30 s	
14 94 °C 10 s	
15 44 °C 1'	
16 72 °C 2' 30 s	1-16 x12
17 72 °C 7' s	17 x1

Ansatz tertiäre TAIL-PCR:	1 µl 1:50 verdünntes primäres PCR-Produkt
	2 µl 10x PCR-Puffer
	1.6 µl dNTPs (10 mM)
	0.4 µl LBb1 (10 µM)
	1.5 µl AD1 (20 µM)
	2 µl AD2 (20 µM)
	2.2 µl AD3 (20 µM)
	1U Taq Polymerase
	ad 20 µl Wasser

Programm tertiäre TAIL-PCR:	Zyklen
1 94 °C 1'	
2 44 °C 1'	
3 72 °C 2' 30 s	1-3 x20
4 72 °C 5'	4 x1

4.4.11 T/A-Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Taq-DNA-Polymerase weist eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität für dATP auf, so dass die meisten bei der Amplifikation entstehenden PCR-Produkte am 3'-Ende ein einzelnes überhängendes Deoxyadenosin (dATP) tragen. Diese Eigenschaft wird von dem Klonierungssystem „TA Cloning Kit“ (Invitrogen) ausgenutzt, denn der speziell zur Subklonierung von PCR-Produkten entwickelte linearisierte Vektor pCR_2.1 besitzt an den 3'-Enden jeweils ein einzelnes überhängendes dTTP, welches eine effiziente Ligation von PCR-Produkten begünstigt. Durch die Konjugation einer Topoisomerase an die Enden des Vektors ist die Ligation innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur möglich. Die Ligationsreaktion wurde entsprechend des Herstellerprotokolls angesetzt und nach 5 min abgestoppt. Sie konnte unmittelbar für die Transformation eingesetzt werden. Der Vektor pCR_2.1 trägt in seiner Polylinker-Region den Promotorabschnitt für die T7 RNA-Polymerase. Außerdem enthält er verschiedene Restriktionsschnittstellen, welche die Charakterisierung der Insertion als auch anschließendes Klonieren in

andere Vektoren ermöglichen. Die Begrenzung der Polylinker-Region durch unterschiedliche Primersequenzen erlaubt die Sequenzierung der DNA-Insertion nach erfolgtem Klonieren. Zusätzlich besitzt der Vektor die Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin, was der Selektion von Plasmid-tragenden Bakterien dient. Die Unterscheidung von rekombinanten und religierten Plasmiden wird dadurch möglich, dass die Unterbrechung des β -Galaktosidasegens bei Insertion die Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff verhindert. Deshalb weisen weiße Kolonien auf LB-Agar-Platten auf transformierte Bakterien mit rekombinanten Plasmiden hin, die anderen Kolonien sind hingegen blau gefärbt.

4.4.12 Ligation von cDNA-Fragmenten in binäre Vektoren

Das molare Verhältnis zwischen linearisiertem Vektor und Restriktions-Fragment beeinflusst die Effizienz einer Ligationsreaktion. Für eine optimale Ligation wurde ein Verhältnis von 5:1 von Fragment- zu Vektor-DNA empfohlen. Die Stoffmenge (in pmol) eines beliebigen DNA-Moleküls kann mit folgender Formel berechnet werden.

$$\text{DNA Menge (in pmol)} = \text{DNA Masse (in pg)} / 660 \text{ (g/mol)} * \text{DNA Länge (in bp)}$$

Ligationsreaktion (20 μ l): 2 μ l 10x T4 Ligase Puffer
 x μ l DNA-Fragment
 0.5 μ g linearisierte Vektor-DNA
 2 U T4 DNA Ligase
 x μ l bidest. H₂O

Das Reaktionsgemisch wurde kurz gemischt und für ca. 3 - 5 s. zentrifugiert.

Der Ansatz wurde nun über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz direkt für die Transformation von E. coli weiter verwendet.

4.4.13 Herstellen einer DIG-UTP-markierten cDNA-Sonde

Mit DIGoxigenin markiertes Uracil-Tri-Phosphat (DIG-UTP) wurde während einer PCR in die cDNA-Sonde eingebaut. Es wurde dabei exakt nach dem Protokoll der Firma Roche vorgegangen.

PCR-Ansatz zur Markierung von cDNA-Sonden:

5 μ l 10 x PCR Puffer (BioTherm)

1 µl dNTP-Mix (10 mM)
5 µl DIG-11-UTP (10 mM)
2.5 µl S-Primer
2.5 µl AS-Primer
50 ng Plasmid (Template)
1 µl Taq-Polymerase (Biotherm)
Ad 50 µl Wasser

Die PCR Ansätze wurden in einem Thermocycler nach dem Standard Protokoll vervielfältigt. Als Kontrolle wurde außerdem eine identische Reaktion ohne DIG-UTP angesetzt, und beide in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. War der Einbau von DIG-UTP in die Sonde erfolgreich, so lief die DNA-Bande aufgrund seiner sperrigeren Struktur ein kleines Stück oberhalb der Kontroll-Bande.

4.4.14 Behandlung der Agarose-Gele für Southern Blots

Für einen Southern Blot ist die gute Auftrennung der DNA im Agarosegel von großer Bedeutung. Deshalb wurde die DNA in 0.7 %igen Agarose-Gelen bei 15 Volt für ca. 8 Stunden aufgetrennt. Damit später die DIG-markierte Sonde an die DNA binden kann, muss anschließend eine Denaturierung durchgeführt werden. Dafür wurde das Gel zweimal für 15 Minuten in Denaturierungslösung und anschließend zweimal für 30 Minuten in Neutralisierungslösung auf einem Schüttler inkubiert.

Denaturierungslösung: 0.5 M NaOH

1.5 M NaCl

Neutralisierungslösung: 1.5 M NaCl

1.0 M Tris/HCl, pH 8.0

4.4.15 Transfer der DNA auf eine Nitrozellulose-Membran (Southern Blot)

Ein Verfahren zum Transfer von DNA aus einem Agarosegel auf eine Membran wird als „Southern Blot“ bezeichnet. Über Kapillarkräfte wurde die DNA vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-N, Amersham Life Science) transferiert. Nach

Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel luftblasenfrei auf einer mit Transferpuffer (10 x SSC) getränkten Membran von der Größe des Gels und einem Stapel saugfähigen Papiers (ca.15 cm) so angeordnet, dass die Unterseite des Gels die Oberfläche der Membran berührt. Die Verbindung zwischen Gel und Pufferreservoir wurde durch das Auflegen eines Streifen Filterpapiers (Whatman 3MM) von der Breite des Gels und etwa 30 cm Länge hergestellt. Der Transfer erfolgte über Nacht vertikal von oben nach unten. Die DNA wurde anschließend auf der Membran durch 120.000 μ Joules UV-Licht (UV Stratalinker 2400, Stratagene) fixiert.

10 x SSC-Puffer: 1.5 M NaCl
 0.15 M Na 3-Citrat; pH 7.0

4.4.16 Hybridisierung von Southern Blots mit DIG-markierter Sonde

Diese Methode wurde für die Hybridisierung mit DIG-11-UTP markierten Sonden angewandt. Eine spätere Detektion der Signale erfolgte über Chemilumineszenz. Das Protokoll, sowie alle verwendeten Reagenzien stammen von der Firma Roche. Vor dem Hybridisieren wurden die Membranen in 2 x SSC/0,5 % SDS gewaschen. Zwecks Prähybridisierung wurde jede Membran in ein Falconröhrchen (50 ml) überführt und mit 10 ml „DIG easy hyb“ in einem Rotor bei 42 °C für mindestens zwei Stunden vorhybridisiert. Für die Hybridisierung wurden 10 – 20 ng pro ml Hybridisierungslösung der jeweiligen Sonde zu 100 μ l „DIG easy hyb“ in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß gegeben, 10 min bei 95 °C denaturiert, danach für 2 min auf Eis gestellt und anschließend zur Membran in das Falconröhrchen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (16 h) bei 42 °C. Die Membranen wurden unter Schütteln gewaschen, zweimal 15 min in 2 x SSC/0,1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal 15 min in 0,5 x SSC/0,1 % SDS bei 62 °C im Wasserbad. Dabei sollte der Waschpuffer schon auf 62 °C vorgewärmt sein. Der letzte Waschschrift erhöhte die Stringenz, d.h. nur die spezifisch gebundenen Sonden blieben an der Membran haften, unspezifisch gebundene Sonden werden abgewaschen.

4.4.17 Antikörper-Nachweis und Detektion

Direkt im Anschluss wurden die Membranen für 5 min in DIG-Waschpuffer und bei Raumtemperatur äquilibriert. Die Membranen wurden 1 h in je 10 ml DIG-Blocking-Puffer (ca. 10 ml auf 10 cm²Membran) bei Raumtemperatur im Rotor geblockt. Vor

der Zugabe des Anti-DIG-Antikörpers wurde dieser für 5 min bei 14 000 rpm zentrifugiert, von der Oberfläche 1 µl der Antikörper-Lösung abgenommen und mit 10 ml DIG-Blocking- Puffer in einem Falconröhrchen vermischt. Die Membran wurde zu der Lösung in das Falconröhrchen gegeben und für 1 h im Rotor bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min in DIG-Waschpuffer auf einem Schüttler gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran 5 min in DIG-Detektionspuffer gewaschen und auf einer ebenen Unterlage auf eine Folie gelegt. Der Anti-DIG-Antikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase (AP) wurde CDP-Star (Amersham) verwendet. Die AP kann CDPStar dephosphorylieren, wobei Anionen frei werden, die sofort zerfallen und Licht emittieren. Die so entstandene Chemilumineszenz kann detektiert werden. Das CDP-Star wurde 1:50 mit DIG-Detektionspuffer (1 ml Lösung pro 100 cm² Membran) verdünnt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach 5 min wurde die CDP-Star-Lösung mit einem Filterpapier abgesaugt und die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die auf dem Southern Blot vorhandenen Signale wurden mittels eines Chemilumineszenz-Detektionsgeräts der Firma BioRad aufgenommen. Die Einstellungen wurden je nach Situation und Signalstärke angepasst und entsprechend modifiziert. Zum kurzfristigen Aufbewahren wurde die Membran in Frischhaltefolie eingewickelt und bei 4 °C gelagert. Für eventuelle spätere Verwendungen wurde die Membran durch 20 minütiges Waschen in 0,1 % SDS bei 95 °C von der Sonde befreit, in Frischhaltefolie eingeschlagen und bei 4 °C gelagert.

DIG-Waschpuffer: 0.1 M Maleinsäure
 0.15 M NaCl
 0.3 % Tween (frisch zugeben)
 pH 7.5

DIG-Detektionspuffer: 0.1 M Tris-HCl
 0.1 M NaCl
 pH 9.5

DIG-Blocking-Puffer: Stammlösung (Roche) wurde 1:10 mit Waschpuffer verdünnt.

4.5 „Stopped-Flow“-Spektrophotometrie

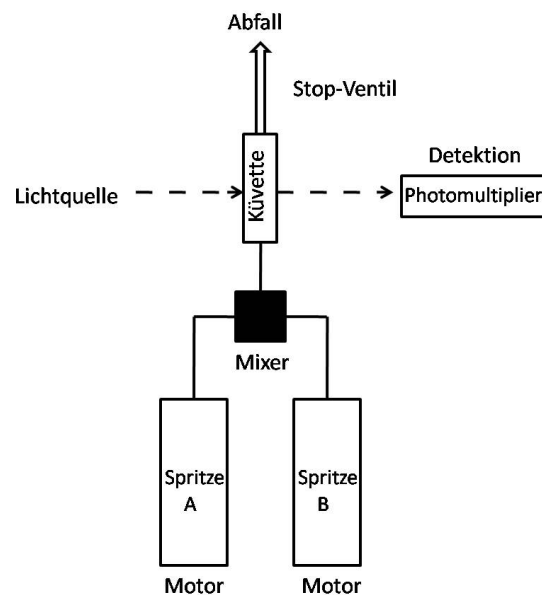


Abbildung 30: Schematische Darstellung der „Stopped-Flow“-Apparatur. Die Mischeinheit bestehend aus Spritze A und B ist durch einen Mixer mit der Detektionseinheit verbunden. In der Detektionseinheit wird die Reaktion in der Küvette durch die Veränderung der Intensität der Fluoreszenz oder des Streulichtes durch einen Photomultiplier wahrgenommen. Der Photomultiplier ist mit einem Computer verbunden, wodurch die Änderungen in der Streulicht- bzw. Fluoreszenz-Intensität aufgezeichnet werden können.

In einem „Stopped-Flow“-Experiment können schnelle Reaktionskinetiken untersucht werden. Die „Stopped-Flow“-Apparatur SFM-300 (Bio-Logic) ermöglicht das schnelle Mischen maximal dreier Lösungen und die anschließende spektrometrische Aufnahme der Reaktion. Um die Messung von Reaktionen bei verschiedenen Temperaturen zu ermöglichen, war die Mischeinheit an einen Thermostaten angeschlossen. Der Mischprozess geschieht mit Hilfe von motorgetriebenen Spritzen, aus denen die Flüssigkeit in eine Mischkammer geleitet wird. Von dort aus gelangt das Gemisch in eine Küvette, der eine weitere Spritze nachgeschaltet ist. Wenn die Flüssigkeit in diese Spritze gedrückt wird, berührt ihr Stempel einen Kontakt, der die Motoren der anderen Spritzen stoppt und somit den Mischvorgang beendet. Der Fluss in der Küvette kommt zum Erliegen und die Reaktion der Lösungen kann von der Detektionseinheit (MOS-250) detektiert werden (schematische Darstellung in Abb. 30).

4.5.1 Untersuchung der Wasserpermeabilität von Hefenprotoplasten mittels „Stopped-Flow“-Spektrophotometrie

Für die Untersuchung der Wasserpermeabilität der Hefen wurden diese vor Beginn der Messung protoplastiert (Material und Methoden, Abschnitt 4.3.6). Die protoplastierten Zellen wurden in Puffer III (1.8 M Sorbit, 50 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) aufgenommen und mit einer hypotonischen Lösung (Puffer IV: 1.2 M Sorbit, 50 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) mit Hilfe des „Stopped-Flow“-Apparates gemischt. In Folge des schnellen Mischprozesses mit der hypotonischen Lösung vergrößert sich das Volumen und somit auch die Oberfläche der Hefeprotoplasten, was eine Änderung der Lichtstreuung zur Folge hat. An der Mischküvette des „Stopped-flow“-Spektrophotometers befindet sich eine Lichtquelle, durch die es möglich ist die Änderung in der Lichtstreuung zu detektieren. Die Lichtsignale werden von einem Photomultiplier in elektronische Signale umgewandelt. Diese Signale werden von der Software Biokine (Bio-Logic) am Computer aufgezeichnet. Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 436 nm und 10 °C. Der Filter wurde auf 1 ms eingestellt. Die Aufzeichnung der Datenpunkte fand wie folgt statt:

Timebase 1 = .0002 sek 4000 Punkte

Timebase 2 = .002 sek 2000 Punkte

Timebase 3 = .02 sek 2000 Punkte

4.5.2 Berechnung des Wasserpermeabilitätskoeffizienten von Hefeprotoplasten

Zur Bestimmung der Ratenkonstanten, wurden den Kinetiken der Streulichtänderung über einen Zeitraum von 8 Sekunden die Summe aus zwei Exponentialfunktionen mit Hilfe des Niokine Algorithmus „simplex“ angeglichen. Für jede Kinetik wurde mit der Software Biokine (Bio-Logic) die Ratenkonstante (k_i) bestimmt. Die angegliche Exponentialfunktion hatte die Gleichung:

$$(1) \quad Y = at + b + \sum_{i=1}^N c_i e^{-k_i t}$$

Die Berechnung des P_f -Wertes (Wasserpermeabilitätskoeffizient) erfolgte nach der Formel von van Heeswijk & van Os (1986) mit Hilfe der von der Software berechneten Ratenkonstanten.

$$(2) \quad P_f = \frac{k_i * V_0}{S_0 * V_w * C_{out}}$$

Dabei bezeichnet k_i die Ratenkonstante, V_0 das Anfangsvolumen des Protoplasten, V_w das partielle molare Volumen von Wasser, S_0 die Anfangsoberfläche des Protoplasten und C_{out} die externe Osmolarität nach der Mischprozedur.

4.5.3 Untersuchung der Ammoniakpermeabilität von Hefezellen mittels „Stopped-Flow“-Spektrophotometrie

Für die Messung der Ammoniakpermeabilität wurden die Hefezellen mit Fluorescein-Bisactetat beladen (siehe Material und Methoden 4.3.4). Die Hefezellen wurden anschließend in Inkubationspuffer (10 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , pH 8.0) aufgenommen. Mittels des „Stopped-flow“-Spektrometers erfolgte ein schneller Mischvorgang mit einem Puffer, der Ammoniumchlorid (10 mM Tris/HCl, 50 mM NH_4Cl), 5 mM CaCl_2 , pH 8.0) enthielt. Wenn Ammoniak über die Hefemembran in das Innere einer Hefezelle permeiert, nimmt der intrazelluläre pH zu. Diese Änderung des pH-Wertes kann mit Hilfe des Fluoreszeins detektiert werden, da eine Änderung des pH-Wertes zu einer Änderung in der Fluoreszenzintensität führt. Diese wird mit einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und mit Hilfe der Biokine-Software am Computer aufgezeichnet. Es wird bei der Messung ein 515 nm Cut-off-Filter verwendet. Die weiteren Einstellungen bei der Messung entsprachen den unter 4.5.1 beschriebenen Einstellungen für die Wasserpermeabilitätsmessungen.

4.5.4 Berechnung der Aktivierungsenergie für den Wasser-, bzw. Ammoniaktransport über die Hefemembran

Um eine Berechnung der Aktivierungsenergie für den Wasser-, bzw. Ammoniaktransport über die Membran zu ermöglichen, wurde Wasser- und Ammoniakpermeabilitätsmessungen mit AtNIP1;1-exprimierenden und nicht exprimierenden Hefezellen bei Temperaturen von 10 °C bis 30°C vorgenommen. Im Arrhenius Plot wurde anschließend der natürliche Logarithmus der Ratenkonstanten bzw. der anfänglichen Steigungen der Kinetiken gegen die Temperatur ($1/K * 1000$)

aufgetragen. Aus den Steigungen im Arrhenius Plot konnte durch Multiplikation der Steigung im Arrhenius Plot mit der allgemeinen Gaskonstanten R ($8,315 \text{ J}/(\text{K}\cdot\text{mol})$) die Aktivierungsenergie E_a (kJ/mol) für den Wasser- bzw. Ammoniaktransport berechnet werden.

4.6 Auswertung von Microarray-Daten (Genevestigator)

Mit Microarray-Daten, die auf der Genevestigator-Homepage (Zimmermann et al., 2004; <https://www.genevestigator.ethz.ch/>) zur Verfügung stehen, wurde eine Untersuchung der Expression von AtNIP1;1 in *A. thaliana* vorgenommen. Die dort eingestellten Daten dürfen unter der Beachtung von Zitierungen ausgewertet und veröffentlicht werden. Die ausgewerteten Daten wurden aus Hybridisierungen von *A. thaliana*-RNA mit dem Affymetrix-Chip Ath1 Genome Array gewonnen. Auf diesem Chip sind mehr als 22 500 Oligonukleotide aufgetragen, die ca. 24 000 Gene von *Arabidopsis thaliana* repräsentieren. Es wurden ausschließlich Experimente ausgewertet, die mit *A. thaliana* var. Col. durchgeführt wurden. Bei der Durchführung der Auswertung wurde den Angaben bei Genevestigator gefolgt.

4.6.1 Untersuchung der Expression von AtNIP1;1 in Abhängigkeit von Salz- und osmotischem Stress

Genevestigator-Microarray-Daten aus Experimenten unter Salzstress- bzw. osmotischen Stress-Bedingungen wurden im Hinblick auf den Einfluss dieser Bedingungen auf die AtNIP1;1-Expression ausgewertet. In diesem Experiment (Kilian et al., 2007) wurden die Pflanzen auf MS-Medium angezogen. 18 Tage nach dem Aussäen und 3 Stunden nach dem Wechsel von Dunkel zu Licht wurden sie Stressbedingungen ausgesetzt. Die RNA-Proben für die Kontrollpflanzen wurden von Pflanzen genommen, die keinen Stressbedingungen ausgesetzt waren, aber davon abgesehen gleich behandelt wurden. Die RNA wurde mit dem Affymetrix-Chip Ath1 hybridisiert und die Ergebnisse bei Genevestigator eingestellt. Um den Salzstress hervorzurufen, wurden 150 mM NaCl zu dem MS-Medium gegeben. Der osmotische Stress wurde durch Zugabe von 300 mM Mannitol in das MS-Medium ausgelöst. Nach 0, ½, 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden kontinuierlichem Stress wurde jeweils RNA aus den Pflanzen isoliert.

4.6.2 Untersuchung der Expression von AtNIP1;1 in Abhängigkeit von Nitrat-Mangel

Genevestigator-Micorarray-Daten aus einem Experiment bei Nitratmangel-Bedingungen wurden im Hinblick auf den Einfluss dieser Bedingungen auf die AtNIP1;1-Expression ausgewertet. Bei diesem Experiment (Scheible et al., 2004) wurden die Keimlinge in Flüssigkultur mit normaler Stickstoffversorgung bei kontinuierlichem Licht angezogen. Nach 7 Tagen wurde ein Teil der Keimlinge in ein Medium mit wenig Stickstoff umgesetzt und zwei Tage später RNA isoliert. Zu diesem Zeitpunkt erhielten einige Keimlinge im Stickstoff-Mangel-Medium 3 mM KNO₃ bzw. 3 mM KCl als Kontrolle. Die Pflanzen wurden 30 Minuten beziehungsweise 3 Stunden später geerntet und die RNA isoliert. Die RNA wurde mit dem Affymetrix-Chip Ath1 hybridisiert und die Ergebnisse bei Genevestigator eingestellt.

4.7 Zelluläre Lokalisation von AtNIP1;1 mittels mGFP4

4.7.1 Herstellung eines AtNIP1;1-mGFP4-Fusionsproteins

Genspezifischen Primern für den cDNA-Abschnitt des AtNIP1;1-Leserasters wurden Schnittstellen für Restriktionsenzyme angefügt, um ein gerichtetes Klonieren zu ermöglichen. Beginn des Sense-Primers war das Start-ATG und Ende des Antisense-Primers war das letzte Codon vor dem Stop Signal des AtNIP1;1. Aus der PCR resultierte die Sequenz des offenen Leserasters für das AtNIP1;1, wobei am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktions-Enzym HindIII und am 3'-Ende eine Schnittstelle für Eco47III angefügt wurde. Das PCR-Produkt wurde mit den entsprechenden Enzymen geschnitten. Der Ziel-Vektor pPILY, der das mGFP4 Gen unter der Kontrolle von zwei 35S Promotoren enthält, wurde ebenfalls mit Eco47III und HindIII geschnitten. Die AtNIP1;1-Sequenz wurde so in den Vektor ligiert, dass nach erfolgter Transkription eine durchgehende AtNIP1;1-mGFP4-mRNA vorlag (Abb. 31), die dann in ein chimäres AtNIP1;1-mGFP4-Protein übersetzt wurde.

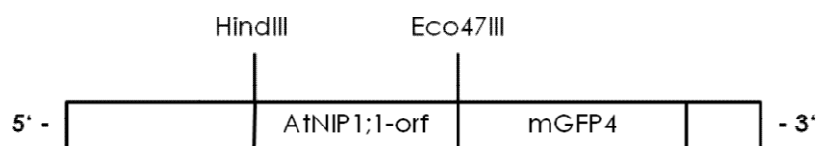


Abbildung 31: Schematische Darstellung eines Ausschnitts des pPILY-Vektors. AtNIP1;1 wurde mit Hilfe der Schnittstellen für HindIII und Eco47III mit mGFP4 fusioniert. Das Fusionsprodukt steht unter der Kontrolle von zwei 35S Promotoren (nicht dargestellt). Eine detaillierte Vektorkarte befindet sich im Anhang.

4.7.2 Beladen der Wolfram-Partikel

Die Transformation erfolgte mit dem Particle Delivery System von BioRad (siehe 2.4.3.1). Die Beladung der Wolfram-Partikel erfolgte nach einem Protokoll von von Arnim, University of Knoxville, Tennessee (in Weigel & Glazebrook, 2002). Die vorbereiteten Partikel wurden für 15 min gevortext. Anschließend wurden pro Bombardment zu 20 µl Wolfram-Partikel 2 µl Plasmid-DNA (1-2 µg/µl), 20 µl eiskaltes CaCl₂ (2,5 M) und 8 µl Spermidin (0,1 M) zugegeben. Es folgte eine 20 – minütige Inkubation auf Eis. Während der Inkubation wurden die Partikel alle ein bis zwei Minuten gevortext. Die Wolfram-Partikel wurden bei 13 000 rpm für 20 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurden die Partikel drei- bis viermal mit 100 % Ethanol gewaschen. Dazu wurden sie zunächst in 20 – 30 µl Ethanol aufgenommen und gevortext. Anschließend wird auf 200 µl Ethanol aufgefüllt, kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Schluss wurden die beladenen Wolfram-Partikel in 8 µl 100 % Ethanol aufgenommen.

4.7.3 Transiente Transformation von Pflanzenteilen

Bei der transienten Transformation von Pflanzenteilen war es nicht unbedingt wichtig steril zu arbeiten, da die Proben nur drei Tage zur Analyse bereit stehen mussten, es wurde jedoch trotzdem weitestgehend steril gearbeitet. Die Partikel- Beschuss-Kammer wurde in dem sterilen Bereich einer Sterilbank aufgebaut und auch die gesamten Vorbereitungen fanden hier statt. Die „Rupture-disk“ (1100 psi, BioRad) und die Makrocarrier (BioRad) wurden in einer Petrischale in Isopropanol eingelegt und bis zum Beginn der Arbeiten auf einen Wankelschüttler gestellt. Die Partikel-Beschuss-Kammer und ihre internen Bestandteile („Rupture-disk“-Kapsel, Makrocarrier-Platte, Proben-Platte) wurden gründlich mit Isopropanol gewaschen. Anschließend wurden die Makrocarrier und die „Rupture-disks“ unter der Sterilbank auf einem autoklavierten Papierhandtuch ausgebreitet und luftgetrocknet. Die trockenen Makrocarrier wurden mit einer hitzesterilisierten Pinzette in die entsprechenden Halteschalen gelegt und mit dem beigelegten Werkzeug in die Halteschiene eingedrückt. Nun wurden die mit DNA beladenen Wolframpartikel vorsichtig resuspendiert und pro Transformation 6 µl der Partikel-Suspension in das Zentrum der Makrocarrier gegeben. Das Ethanol der Suspension sollte danach soweit abtrocknen, dass die Partikel eine feste Bindung mit dem Makrocarrier eingehen. Während das Ethanol abtrocknet, konnten die Zielzellen vorbereitet werden. Es

wurden die Schuppen einer Zwiebel auf MS-Platten ausgelegt, so dass die Innenseite der Schuppe nach oben zeigte. Die „Rupture-disk“, Makrocarrier mit Goldpartikel und die Proben können nun in die Beschuss-Kammer eingebaut werden. Hierzu wurde die „Rupture-disk“- Kapsel vor das Heliumventil geschraubt, die Makrocarrier-Platte in die oberste Schiene und die Proben-Platte in die dritte Schiene von oben eingeschoben. Die Kammer wurde mit dem Riegel fest verschlossen und das Vakuum bis zu einem Wert von 27 Hg aufgebaut. Der Heliumdruck wurde an der Gasflasche mit dem Druckwandler auf 2 - 2.5 bar eingestellt. Ist das Vakuum aufgebaut, wurde der Schalter „fire“ gedrückt und solange festgehalten bis der Zerreissdruck der „Rupture-disk“ erreicht war. Zerreist die „Rupture-disk“, wurde der Schalter losgelassen und der Transformationsprozess lief innerhalb weniger Millisekunden ab. Anschließend wurde der Schalter des Vakuums auf die Position „vent“ gebracht und die Kammer wieder mit Luft gefüllt. Die transformierte Zwiebelschuppe wurde aus der Kammer genommen und bei RT in eine Schublade gelegt, um ein Ausbleichen des GFPs zu verhindern.

4.7.3.1 Analyse der transformierten Zellen unter einem CLSM

Die subzelluläre Lokalisation der exprimierten fluoreszierenden Fusionsproteine wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM, Leica TCS) analysiert. Dazu wurde die Epidermis der transformierten Zwiebelschuppe vorsichtig mit einer Pinzette von der Innenseite der Schuppe abgezogen und in einen Wassertropfen auf einen Objektträger gelegt. Die fluoreszierenden Zellen, bzw. Zellbestandteile wurden mit Hilfe von UV-Licht angeregt und unter dem Mikroskop visualisiert. Wurde eine GFP-fluoreszierende Zelle gefunden, schaltete man das Mikroskop von der visuellen Einstellung in die des Lasers um. Der Laser tastet nun das Gewebe ab und stellt das erhaltene Fluoreszenz-Bild auf dem Bildschirm dar. Das Bild wurde gespeichert und konnte mit Hilfe von Bildbearbeitungssoftware bearbeitet werden. Zur Erhöhung des Kontrastes und der Helligkeit wurde hier das Programm „Photoshop“ der Fa. Adobe verwendet.

4.8 Lokalisation der AtNIP1;1-Expression

4.8.1 Klonierung des AtNIP1;1-Promoters

Das *A. thaliana*-Genom ist komplett sequenziert, so war es problemlos möglich die Region 5' aufwärts des AtNIP1;1-Gens zu ermitteln. Es wurde ein 1200 bp großes Fragment (siehe Anhang) für die Klonierung des Promoters verwendet.

4.8.2 Die Gateway®-Cloning Technologie

Das Konstrukt für die Transformation von *A. thaliana* mit einer AtNIP1;1-Promoter-GUS-Fusion wurden mit Hilfe der Gateway®-Cloning Technologie (Invitrogen) hergestellt. Diese beruht auf dem Rekombinationsprinzip, das dem Bakteriophagen λ verhilft sich in das *E. coli* Chromosom zu integrieren und zwischen dem lytischen und lysogenen Zyklus zu wechseln. Dabei dienen die sog. attachment (*att*) sites, *attB*-DNA-Sequenzen auf dem *E. coli* Chromosom und *attP*-DNA-Sequenzen auf dem Chromosom des Phagen λ , als Bindungsstellen für die Rekombinationsenzyme. Bei der Gateway®-Cloning Technologie wird zunächst das gewünschte Gen (hier der AtNIP1;1-Promoter) in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch spezielle *attB*-Primer mit den *attB*-DNA-Sequenzen versehen. Dann erfolgt die BP Rekombinationsreaktion zwischen den *attB*-DNA-Sequenzen des PCR-Produkts und den *attP*-DNA-Sequenzen des Donorvektors (pDONR Zeo), wobei ein Ausgangsklon (Entry Clone) mit *attL*-DNA-Sequenzen und ein Nebenprodukt (by-product) mit *attR*-DNA-Sequenzen entstehen. Hierfür wird der BP Clonase™ Enzyme Mix verwendet, der aus einem Gemisch aus Enzymen des Phagen λ und *E. coli* besteht, die die Rekombinationsreaktion vermitteln.



Abbildung 32: Schema der BP Rekombination zwischen dem *attB*-flankierten PCR-Produkt und einem entsprechenden Donorvektor. Als Endprodukt entsteht der Ausgangsklon (Entry Clone).

Durch eine zweite Rekombination, die LR-Reaktion, zwischen dem Ausgangsklon und einem Zielvektor (Destination Vector), bei der die *attL*-DNA-Sequenzen des Ausgangsklon mit den *attR*-DNA-Sequenzen des Zielvektors rekombinieren, entstehen

der Expressionsklon mit den attB-DNA-Sequenzen und ein Nebenprodukt mit den attP-DNA-Sequenzen.



Abbildung 33: Schema der LR Reaktion zwischen dem entstandenen Ausgangsklon (Entry Clone) und einem Zielvektor (Destination Vector), welche den Expressionsklon (Expression Clone) liefert.

Zur Durchführung der beiden Rekombinationsreaktionen wurde nach den Protokollen des Gateway® Technology Manuals verfahren. Für die Klonierung wurde der pDONR™201Zeo Donorvektor (Invitrogen) und der Zielvektor pMDC164 (Curtis et al., 2003) für die GUS-Fusion (Destination Vector) verwendet. Mit letzterem wurden schließlich *A. thaliana* var. Columbia transformiert.

4.8.3 Fusion des AtNIP1;1-Promotors mit einem GUS-Reportergen

Es stand ein Vektor (pMDC164) zur Verfügung, der eine cDNA-Sequenz für eine Glucuronidase als Reportergen enthielt. In dem Vektor war dem GUS-Gen kein Promoter vorgeschaltet, an diese Stelle wurde mit Hilfe der Gateway-Technologie der AtNIP1;1-Promotor kloniert. Der fertige Pflanzenvektor wurde zunächst in *E. coli*-Zellen transformiert und nach Vermehrung der Transformanten wurden die Plasmide auf Richtigkeit überprüft. Anschließend wurde das Plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* eingebracht, und mit Hilfe dieser das AtNIP1;1-Promotor-GUS- stabil in *A. thaliana* transformiert (siehe Material und Methoden 4.9).

4.8.4 GUS-Test zur Lokalisation der Genexpression

Die mit den AtNIP1;1-Promotor-GUS-Konstrukten transformierten *A. thaliana* wurden in ein Falcon-Röhrchen mit X-Gluc- Lösung gegeben, so dass die Probe völlig von der Lösung bedeckt war. Die Gefäße wurden offen in einen Exikator gestellt und für 2 - 5 min Vakuum angelegt (bis kleine Bläschen aus den Pflanzenteilen austreten). Danach wurden die Proben über Nacht bei 37 °C im Dunkel belassen und am nächsten Tag untersucht und fotografiert.

X-Gluc-Lösung: 1 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Glucuronid

1x Phosphat-Puffer

500 μ M $K_4[Fe(CN)_6 \times 3H_2O]$

500 μ M $K_3[Fe(CN)_6]$

10 mM EDTA

0,1 % Triton X-100

10x Phosphat-Puffer: 0,5 M NaH_2PO_4

0,5 M Na_2HPO_4 pH 7.0

4.9 Stabile Transformation von *A. thaliana* mittels „Floral Dip“

4.9.1 Präparation von *A. tumefaciens* für die Transformation

Aus einer Einzelkultur wurden die mit den entsprechenden Konstrukten transformierten Agrobakterien in 5 ml LB-Medium (mit Rifampicin und Hygromycin) angeimpft und für 2 Tage bei 28 °C und 225 rpm inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml YEP-Medium angeimpft und für 24 Stunden bei 28 °C und 225 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 5000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Anschließend wurden die Agrobakterien in 500 ml Transformationsmedium aufgenommen.

Transformationsmedium: 5 % Saccharose
 0.005 % Silwet L-77 (Lehle Seeds)

4.9.2 Transformation von *A. thaliana* mittels „Floral-Dip“

A. thaliana-Pflanzen (var. Columbia) wurden bis zum Erscheinen der ersten Blütenstände kultiviert. Diese wurden entfernt, nachdem alle Pflanzen Blütenstände aufwiesen, um ein zeitgleiches Erscheinen der zweiten Blütenstände und eine größere Anzahl von Blütenständen zu induzieren. Erreichten die Blütenstände eine Höhe von 5-10 cm wurde die Transformation der Pflanzen mit der „Floral-Dip“-Methode (Clough & Bent, 1998) vorgenommen. Dazu wurden die Blütenstände für 30 s in die vorbereiteten Agrobakterien-Suspensionen gehalten. Anschließend wurden die Pflanzen auf die Seite gelegt und mit einer durchsichtigen Folie bedeckt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu garantieren. Nach 24 Stunden wurde die Folie

entfernt und die Pflanzen 2-3mal mit autoklaviertem bidest. Wasser gewaschen und im Anschluss bis zur Samenernte normal weiter kultiviert.

4.9.3 Selektion transformierter *A. thaliana*-Pflanzen

Die Selektion erfolgte nach einem Protokoll von Harrison et al. (2006). Dazu wurden die sterilisierten Samen auf MS-Agar mit 70 µg/ml Hygromycin B ausgebracht. Die Platten wurden für 2 Tage bei 4 °C in der Dunkelheit gelagert. Anschließend wurden sie für 6 Stunden Licht ausgesetzt, um die Keimung zu induzieren. Nach weiteren 2 Tagen in der Dunkelheit wurden sie für einen weiteren Tag in der Klimakammer bei 8 Std. Licht inkubiert.



Abbildung 34: Selektion transformierter *A. thaliana*-Pflanzen auf MS-Agar mit Hygromycin; transformierte Pflanzen zeichnen sich durch ein deutlich verlängertes Hypokotyl aus.

Im Anschluss konnte die Selektion der transformierten Keimlinge erfolgen. Transformanten zeichneten sich durch ein deutlich verlängertes Hypokotyl aus und konnten so leicht von nicht transformierten Pflanzen unterschieden werden (Abb. 34). Die transformierten Pflanzen wurden auf Erde bzw. MS-Agar umgesetzt, da Hygromycin B auch diese dauerhaft in ihrer Entwicklung behindert.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das pflanzliche Aquaporin AtNIP1;1 funktionell charakterisiert werden. Das besondere Interesse galt hier einer möglichen Ammoniakleitfähigkeit dieses Aquaporins.

AtNIP1;1 wurde mit Hilfe eines Hefeexpressionssystem im Hinblick auf seine Wasser- und Ammoniakleitfähigkeit untersucht. Dabei zeigte sich, dass AtNIP1;1 eine moderate Wasserleitfähigkeit besitzt und zudem eine Ammoniakleitfähigkeit aufweist.

Bei vielen Aquaporinen lässt sich die Wasserleitfähigkeit mit Hilfe von Quecksilberchlorid inhibieren. Auch AtNIP1;1 wurde in der vorliegenden Arbeit auf seine Quecksilbersensitivität hin untersucht. Es konnte dabei zwar die Ammoniakleitfähigkeit von AtNIP1;1 durch Quecksilberchlorid inhibiert werden, nicht jedoch die Wasserleitfähigkeit. Dies wirft die Frage auf, ob die beiden Moleküle unterschiedliche „Wege“ durch das Aquaporin nehmen.

Um Hinweise auf die Funktion des Aquaporins in der Pflanze zu erhalten, wurde die Expression und Lokalisation von AtNIP1;1 untersucht. AtNIP1;1 wird nahezu ausschließlich in der Wurzel von *A. thaliana* exprimiert, lediglich in den Samen findet ebenfalls eine erhöhte Expression statt. Eine Analyse der Promotor-Aktivität mittels einer AtNIP1;1-Promotor/GUS-Fusion zeigte eine Aktivität des Reportergens in der Wurzelspitze und im Zentralzylinder der Wurzel, sowie in den Leitgefäßen der Blätter. Zudem wurde die subzelluläre Lokalisation von AtNIP1;1 ermittelt. Dabei zeigte sich eine Expression des Aquaporins in der Plasmamembran.

Die Ergebnisse weisen auf eine Funktion von AtNIP1;1 in der Regulation des Wasser- und Stickstoffhaushaltes der Pflanze hin. Um Aussagen über die physiologische Funktion von AtNIP1;1 in der Pflanze treffen zu können, sollten Untersuchungen mit entsprechenden T-DNA-Insertionslinien durchgeführt werden. In diesen Linien lagen jedoch zusätzliche T-DNA-Insertionen in der genomischen DNA von *A. thaliana* vor, so dass diese zunächst ausgekreuzt werden müssen, ehe mit ihrer Hilfe Funktionsanalysen im homologen System vorgenommen werden können.

6. Literaturverzeichnis

- Agre, P., King, L.S., Yasui, M., Guggino, W.B., Ottersen, O.P., Fujiyoshi, Y., Engel, A., Nielsen, S. (2002). Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542, 3-16.
- Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjövall-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., Johansson, U., Kjellbom, P. (2005). Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant. Mol. Biol.* 59, 469-484
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmermann, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C.m Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geratl, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, C., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., Ecker, J.R. (2003). Genome-Wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.
- Beitz, E., Wu, B., Holm, L.M., Schultz, J.E., Zeuthen, T. (2006). Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *PNAS* 103 (2), 269-274.
- Bertl, A., Bihler, H., Reid, J.D., Kettner, C., Slayman, C.L. (1998). Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K⁺ channel, DUK1 (TOK1), in situ. *J Membr Biol* 162, 67-80.
- Bertl, A. & Kaldenhoff, R. (2007). Function of a separate NH₃-pore in Aquaporin TIP2;2 from wheat. *FEBS Letters* 581 (28), 5413-5417.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.-T., Sorieul, M. van den Dries, N., Maurel, C. (2005). Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and Cellular Features of Aquaporin Expression. *Plant Physiology* 139, 790-805.
- Brown, A.D. (1978). Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms. *Adv Microb Physiol* 17, 181-242.
- Cabello-Hurtado, F., Ramos, J. (2004). Isolation and functional analysis of the glycerol permease activity of two new nodulin-like intrinsic proteins from salt stressed roots of the halophyte *Atriplex nummularia*. *Plant Science* 166, 633-640.

- Caparrós-Martín, J.A., Reiland, S., Köchert, K., Cutanda, M.C., Culiáñez-Macià, F.A. (2007). *Arabidopsis thaliana* AtGpp1 and AtGpp2: two novel low molecular weight phosphatases involved in plant glycerol metabolism. *Plant Mol Biol* 63, 505-517.
- Carvajal M., Cooke D.T., Clarkson D.T. (1996). Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of waterchannel function. *Planta* 199, 372–381.
- Clarkson DT, Carvajal M, Henzler T, Waterhouse RN, Smyth AJ, Cooke DT, Steudle E. (2000). Root hydraulic conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *Journal of Experimental Botany* 51, 61–70.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Wojcik, E., Chrispeels, M.J., and Jung, R. (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol* 125, 1206-1215.
- Choi, W.-G., Roberts, D.M. (2007). *Arabidopsis* NIP2;1: a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. *JBC* 282 (32), 24209-25218.
- Clough, S.J., & Bent, A.F. (1998). Floral Dip. A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16 (6), 735-743.
- Crawford, N. & Glass, A.D.M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* 3, 389-395.
- Curtis, M.D., Grossniklaus, U. (2003). A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133, 462-269.
- Dean, R.M., Rivers, R.L., Zeidel, M.L., Roberts, D.M. (1999). Purification and functional reconstitution of soybean nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties. *Biochemistry* 38, 347-353.
- Dolferus, R. (1991). Isolation of DNA and RNA from *Arabidopsis thaliana*. In: *Bio Methods*, Negrutia, J., Gharti-Chhetri, G.B. eds, Birkhäuser Verlag 4, 131-146
- de Groot, B.L., and Grubmuller, H. (2001). Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* 294, 2353-2357.
- de Groot, B.L., Frigato, T., Helms, V., and Grubmuller, H. (2003). The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. *J Mol Biol* 333, 279-293.

Finnemann, J., Schjoerring J.K. (1999). Translocation of NH_4^+ in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. *Physiol Plant* 105, 469–477

Fortin, M.G., Morrison, N.A., Verma, D.P.S. (1987). Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Research* 15 (2), 813-824.

Gerbeau, P., Guclu, J., Ripoché, P., Maurel, C. (1999). Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J* 18, 577-587.

Gloser, V., Zwieniecki, M.A., Orians, C.M., Holbrook, N.M. (2007). Dynamic changes in root hydraulic properties in response to nitrate availability. *J Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/erm118

Harrison, S.J., Mott, E.K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J.C., Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* 2:19.

Holm, L.M., Jahn, T.P., Moller, A.L., Schjoerring, J.K., Ferri, D., Klaerke, D.A., Zeuthen, T. (2005). NH_3 and NH_4^+ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch* 450, 415-428.

Huang, N.-C., Liu, H.-K., Lo, H.-J., Tsay, Y.F. (1999). Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* 11, 1381-1392.

Ishikawa, F., Suga, S., Uemura, T., Sato, M.H., Maeshima, M. (2005). Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 579, 5814-5820.

Ishiyama, K., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Obara, M., Yamaya, T., Takahashi, H. (2004). Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of Glutamine Synthetase in *Arabidopsis*. *JBC* 279 (16), 16598-16605.

Jahn, T.P., Moller, A.L., Zeuthen, T., Holm, L.M., Klaerke, D.A., Mohsin, B., Kuhlbrandt, W., Schjoerring, J.K. (2004). Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett* 574, 31-36.

Johanson, U., & Gustavsson, S. (2002). A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Mol Biol Evol* 19, 456-461.

Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Frayssé, L., Weig, A.R., Kjellbom, P. (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol* 126, 1358- 1369.

Klebl, F., Wolf, M., Sauer, N. (2003). A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by CpNIP1, a Nod26-like protein from zucchini (*Cucurbita pepo* L.), and by *Arabidopsis thaliana* δ -TIP or γ -TIP. *FEBS Letters* 547, 69-74.

Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Harter, K. (2007). The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J* 50, 347-363.

Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Whittier, R.F. (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* 8 (3), 457-463.

Loqué, D., Ludewig, U., Yuan, L., von Wirén, N. (2005). Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiol* 137, 671-680.

Ludewig, U., Wilkens, S., Wu, B., Jost, W., Obrdlik, P., El Bakkoury, M., Marini, A.-M., André, B., Hamacher, T., Boles, E., von Wirén, N., Frommer, W.B. (2003). Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 NH₄ uniporters. *J Biol Chem* 278 (46), 45603-45610.

Ludewig, U., Neuhäuser, B., Dynowski, M. (2007). Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters* 581 (12), 2301-2308

Niemietz, C.M., & Tyerman, S.D. (2000). Channel-mediated permeation of ammonia gas through the peribacteroid membrane of soybean nodules. *FEBS Lett* 465, 110-114.

- Ma, J.F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., Yano, M. (2006). A silicon transporter in rice. *Nature Letters* 440, 688-691.
- Marini, A.-M., Vissers, S., Urrestarazu, A., André, B. (1994). Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 13 (15), 3456-3463.
- Marini, A.-M., Soussi-Boudekou, S., Vissers, S., André, B. (1997). A Family of Ammonium Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol and Cell Biol* 17 (8), 4282-4293.
- Martinez-Ballesta, M.C., Aparicio, F., Pallas, V., Martinez, V., Carvajal, M. (2003). Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP-expression in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol* 260, 675-697.
- Maurel, C., Javot, H., Lauvergeat, V., Gerbeau, P., Tournaire, C., Santoni, V., Chrispeels, M.J. (2000). Molecular physiology of Aquaporins in plants. *Int Rev Cytol* 215, 105-148.
- Mitani, N., Yamaji, N., Ma, J.F. (2008). Characterization of substrate specificity of a silicon rice transporter, Lsi1. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* (in press)
- Mizutani, M., Wasabe, S., Nagakawa, T., Maeshima, M. (2006). Aquaporin NIP2;1 is mainly localized to the ER membrane and shows root-specific accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47 (10), 1420-1426.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A., and Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407, 599-605.
- Ninnemann, O., Jauniaux, J.C., Frommer, W.B. (1994). Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. *EMBO J* 13 (15), 3464-3471.
- Quigley, F., Rosenberg, J.M., Shachar-Hill, Y., and Bohnert, H.J. (2002). From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol* 3, RESEARCH0001.
- Rawat, S.R., Silim, S.N., Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M. (1999). AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels.
- Rougé, P. & Barre, A. (2008). A molecular modeling approach defines a new group of Nodulin26-like aquaporins in plants. *BBRC* 367, 60-66.

- Rivers, R.L., Dean, R.M., Chandy, G., Hall, J.E., Roberts, D.M., Zeidel, M.L. (1997). Functional analysis of nodulin 26, an aquaporin in soybean root nodule symbiosomes. *J Biol Chem* 272, 16256-16261.
- Sanford, J.C., Smith, F.D., Russell, J.A. (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol* 217, 483-509.
- Scheible, W.-R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, Ch., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K., Stitt, M. (2004). Genome-Wide Reprogramming of Primary and Secondary Metabolism, Protein Synthesis, Cellular Growth Processes, and the Regulatory Infrastructure of Arabidopsis in Response to Nitrogen. *Plant Physiol* 136, 2483-2499.
- Sui, H., Han, B.G., Lee, J.K., Walian, P., and Jap, B.K. (2001). Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 414, 872- 78.
- Takano, J., Wada, M., Ludewig, U., Schaaf, G., von Wiren, N., Fujiwara, T. (2006). The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18, 1498-1509.
- Tsay, Y.F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A., Crawford, N.M. (1993). The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate-transporter. *Cell* 72, 705-713.
- Uehlein, N., Fileschi, K., Eckert, M., Bienert, G.P., Bertl, A., Kaldenhoff, R. (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry* 68 (1), 122-129.
- Uehlein, N., Lovisolo, C., Siefritz, F., Kaldenhoff, R. (2003). The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* 425, 734-737.
- Uehlein, N., Otto, B., Hanson, D.T., Fischer, M., McDowell, N., Kaldenhoff, R. (2008). Function of *Nicotiana tabacum* Aquaporins as Chloroplast Gas Pores Challenges the Concept of Membrane CO₂ Permeability. *The Plant Cell Preview*, [Www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.107.054023](http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.107.054023)
- Ullrich, W.R., Larsson, M., Larsson, C.-M., Lesch, S., Novacky, A. (1984). Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential change and inhibition of anion uptake. *Physiol Plant* 61, 369-376.

- van Heeswijk, M.P., and van Os, C.H. (1986). Osmotic water permeabilities of brush border and basolateral membrane vesicles from rat renal cortex and small intestine. *J Membr Biol* 92, 183-193.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J., Pantoja, O. (2004). Novel Regulation of Aquaporins during Osmotic Stress. *Plant Phys* 135, 2318-2329.
- von Wirén, N., Gazzarrini, S., Gojon, A., Frommer, W.B. (2000): The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr Op Plant Biol* 3, 254-261.
- von Wirén, N., Merrick, M. (2004). Regulation and function of ammonium carriers in plants, yeast and bacteria. In E Boles, R Krämer, eds, *Topics in Current Genetics: Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport*. Springer-Verlag, Berlin.
- Wallace, I.S., Choi, W.G., Roberts, D.M. (2006). The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochim Biophys Acta* 1758, 1165-1175.
- Wallace, I.S., Roberts, D.M. (2005). Distinct Transport Selectivity of Two Structural Subclasses of the Nodulin-like Intrinsic Protein Family of Plant Aquaglyceroporin Channels. *Biochemistry* 44, 16826-16834.
- Wallace, I.S., Wills, D.M., Guenther, J.F., Roberts, D.M. (2002). Functional selectivity for glycerol of the nodulin 26 subfamily of plant membrane intrinsic proteins. *FEBS Letters* 523, 109-112.
- Wang, M., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., Glass, A.D.M. (1993). Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma. *Plant Physiol* 103, 11-22
- Wang, Y., Cohen, J., Boron, W.F., Schulten, K., Tajkhorshid, E. (2007). Exploring gas permeability of cellular membranes and membrane channels with molecular dynamics. *Journal of Structural Biology* 157, 534-544.
- Weaver, C.D., Crombie, B., Stacey, G., Roberts, D.M. (1991). Calcium-Dependent Phosphorylation of Symbiosome Membrane Proteins from Nitrogen-Fixing Soybean Nodules : Evidence for Phosphorylation of Nodulin-26. *Plant Physiol* 95 (1), 222-227.
- Weig, A.R., Deswarte, C., Chrispeels, M.J. (1997). The Major Intrinsic Protein Family of Arabidopsis Has 23 Members That Form Three Distinct Groups with Functional Aquaporins in Each Group. *Plant Physiol* 114, 1347-1357.

Weig, A.R., & Jakob, C. (2000). Functional identification of the glycerol permease activity of *Arabidopsis thaliana* NLM1 and NLM2 proteins by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 481, 293-298.

Weig, A.R. & Jakob, C. (2000) in: *Molecular Biology and Physiology of Water and Solute Transport* (Hohmann, S. and Nielsen, S., Eds.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, Dordrecht

Weigel, D. & Glattebrook, J. eds. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbor, New York

Yang, B., Fukuda, N., van Hoek, A., Matthay, M.A., Ma, T., Verkman, A.S. (2000). Carbon Dioxide permeability of Aquaporin-1 measured in erythrocytes and lung of Aquaporin-1 null mice and in reconstituted proteoliposomes. *JBC* 276 (4), 2686-2692

Zardoya, R., Ding, X., Kitagawa, Y., Chrispeels, M.J. (2002). Origin of plant glycerol transporters by horizontal gene transfer and functional recruitment. *PNAS* 99 (23), 14893-14896.

Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Hennig L., Gruissem W. (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol* 136, 2621-2632.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

-xg	-mal Erdbeschleunigung
μ	Mikro
AtNIP1;1	Arabidopsis thaliana Nodulin26-like Intrinsic Protein 1;1
AQP	Aquaporin
A. thaliana	Arabidopsis thaliana
A. tumefaciens	Agrobakterium tumefaciens
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidditriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
GFP	englisch: green fluorescent protein
GS	Glutaminsynthetase
h	Stunde
HATS	engl.: high affinity ammonium transporter system
HCl	Salzsäure
l	Liter
LATS	engl.: low affinity ammonium transporter system
m	Meter
M	Molar
m ²	Quadratmeter

mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mosmol	Milliosmolar
mRNA	englisch: messenger RNA
MS-Medium	Murashige-Skoog-Medium
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NIP	engl.: Nodulin26-like Intrinsic Protein
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NtAQP1	Nicotiana tabacum AQP1
PCR	Polymerase Ketten-Reaktion
Pf	osmotischer Permeabilitätskoeffizient
PIP	englisch: Plasmamembrane Intrinsic Protein
pmol	Picomol = 10 ⁻¹² Mol
PPFD	engl.: photosynthetic photon flux density
ppm	engl.: parts per million
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	englisch: rounds per minute
s	Sekunde
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS englisch:	Sodium Dodecylsulfate
SIP	engl.: Small and basic Intrinsic Protein
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>

T-DNA	transferierte DNA
TIP	englisch: Tonoplast Intrinsic Protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	englisch: Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol.	Volumen

7.2 Primer

Name	Sequenz	Tm
AD1	5´(AGCT)TCGA(GC)T(AT)T(GC)G(AT)GTT3´	42.7 °C
AD2	5´(AGCT)GTCGA(GC)(AT)GA(AGCT)A(AT)GAA3´	46.6 °C
AD3	5´(AT)GTG(AGCT)AG(AT)A(AGCT)CA(AGCT)AGA3´	45.3 °C
AthNIP1_for	5´CGAAGCTTACCATGGCGGATATCTCGGGA 3´	69.5 °C
AthNIP1_rev	5´GCCTCGAGTCAAGTGCTACCGATTCTC 3´	68.0 °C
AtNIP1;1_for	5´GGATATCTCGGGAAACGGCTATGG 3´	64.4 °C
AtNIP1;1_rev	5´GCACCCGCAATCGCACCAAGAG 3´	65.8 °C
AtNIP1;1_GFP_rev	5´TATAGCGCTAGTGCTACCGATTCTCACGG 3´	68.9 °C
AtNIP1;1_PRO_G at_for	5´GGGGAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTATTTGGCA CCATACATCATGCAC 3´	73.3 °C
AtNIP1;1_PRO_G at_rev	5´GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGAGA AGTTTGGTAGCGATTATCTCC 3´	75.2 °C
AtNIP1;1XV_for	5´ATAGGATCCATGGCGGATATCTCGGGA 3´	66.5 °C
AtNIP1;1XV_rev	5´ATAAAGCTTTCAAGTGCTACCGATGATTCTCA 3´	62.4 °C
LBa1	5´TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG 3´	64.0 °C
LBb1	5´GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT 3´	65.8 °C

LBc1	5'CGGAACCACCATCAAACAGGAT 3'	60.3 °C
T-DNA_for	5'ACTCCATGGCCTTTGATTCAGTGG 3'	62.7 °C
T-DNA_rev	5'TGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGG 3'	62.7 °C

7.3 Sequenzen

7.3.1 AtNIP1;1-Promotorregion

GAGAAGTTTGGTAGCGATTATCTCCTATTATTGGCAAACATGGGGGAGAGAGAGACTT
CTTTGACGATTTAATATTACCAGTTTATTAATTGAAAAAAGAAGAAGATGATATATTGTTA
ATAAAGCTTTTTAATAATAATAAATCCTATGTTTGTGGAGATTCTATACCAGGTCTCAAATT
CAATTTTCAGGGATTACAATTTTTCTTAGATCAACAAATATAAAATTTATCGAAAATTTAGA
ATGCTACATGCAGAATTTGTTTGTGTTGATCTTGTGTGTTGTGCAGAGAGCCTATATCATTGG
TGCATGTCGTACATGCATAACCATCCGCGCCTAGGATTCAAATGTTGCATACTTGCAAT
CTACTTTTTGTTTTAAATTTTTATTCTACTTTCCAAATATTCATTATAATCACATAAGTATATATAC
GTCATTTTATGCGTTGTTTGATTTCACATAAGTATTCATTAGAACATCTCATATCGAATTCTG
AATTTTCGGATATAAAGTCACCGGTCATATGTTGTTACACCCAAATTTGTTTCGTATCATATAA
ACAAAACAAAATTATGTCATGCAAACCTATAGAATAAACTATATCATTATGAGAAATTGAA
AAATGTCACTAGATGGAATTGATGATGGCCTCTTAAAGTCTTCAACTACCAAGCGGGTA
ATACGGACATACTTTATTAGCTTATAGTTGTGCATGTGTACATATGTACACAACATTATAA
AAATTACTAAAAAATTTCAAGATATTTTATATATACCTTGATGCCAACGTAACAATCTTGATT
GCGATCCGTAAACTTAATGTAGTGTACTGTTGGATCCGATCATATCAACCTCAGGTTTG
AATCCATACTAACATATAACTAAATGTTAATTATGATCAGAATGTTTTATTGCGACAATACT
CAAAATGTCATCTCTAGATTAGGTTAAGTTCGAACCCTCTTAATGGATGTTAGAAATGTAG
GGTTGTGGCCACGGGCCACCAGAGAAAAAATGAAGTTTCTTTATAATGTACAATTTGAA
TTATCAGTAAATTAGCAATGTTAATTCCACATGTAAACACGTATGCTGGTTAATGGTGACA
AGACAAATCTTAAAGACTTTTCATGTTACGTATCGATCCAGATGTGCATGATGTATGGTGC
CAAAAAAATAGGAGGAGTGAATATGAATTGAAATTGAGAACATACATATATGCAAAGG
GAAGGTAAATAAAGAATATTCAGAAAGAAAAAGAAACATTGATGTAAATGTAGGAGT
ATCAAAGTCGATCAAAATTAGTAGATC

7.3.2 Sequenz T-DNA-Insertionslinie N516617

AATCCAAAAAATGATTATACGGTTATGTTCAATTTATTAGACCGGTATCGAGTGCG
TCGATGAATCCAGGAAGAAGTTTAGGACCTGCACTGGTCTATGGTTGCTACAAAGGA
ATTGG

7.3.3 Sequenz T-DNA-Insertionslinie N517916

CCAAATTCCTTTGTAGCAACCATAGACCAGTGCAGGTCCTAACTTCTCCTGGATTCA
CGACGCACTCGATACCGGTCTAATAAAATTGATGAACATAACCGTATAAATCATTTTTG
GAATTGTTAGAGTTAG

7.3.4 Sequenz T-DNA-Sonde (Southern Blot)

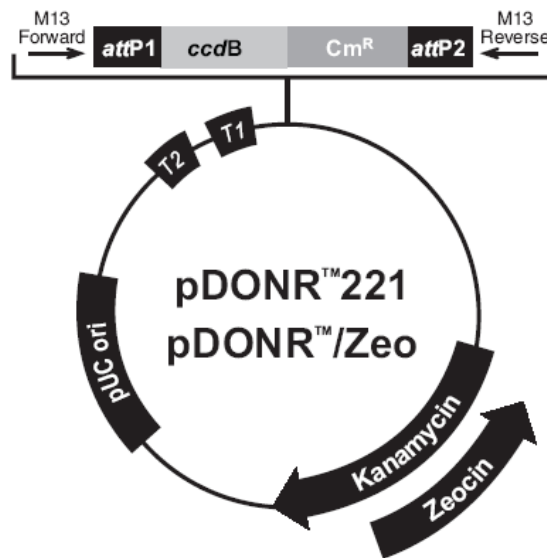
ACTCCATGGCCTTTGATTCAGTGGGAACCTTTTTAGAGACTCCAATCTCTATTACTTG
CCTTGGTTTGTGAAGCAAGCCTTGAATCGTCCATACTGGAATAGTACTTCTGATCTTGAG
AAATATATCTTTCTCTGTGTTCTTGATGCAGTTAGTCCTGAATCTTTGACTGCATCTTAACT
TCTTGGGAAGGTATTTGATTCCTGGAGATTATTGCTCGGGTAGATCGTCTTGATGAGAC
CTGCTGCGTAAGCCTCTCTAACCATCTGTGGGTTAGCATTCTTCTGAAATTGAAAAGGC
TAATCTGGGGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCT
GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAG
TGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCAC
TGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAA
CGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGGTATTGGGCCAAAGACAAAAGGGCGACATTCA
ACCGATTGAGGGAGGGAAGGTAAATATTGACGGAAATTATCATTAAAGGTGAATTATC
ACCGTCACCGACTTGAGCCATTGGGAATTAGAGCCAGCAAAATCACCAGTAGCAC
CA

7.4 Ein-, bzw. Dreibuchstabencode der Aminosäuren

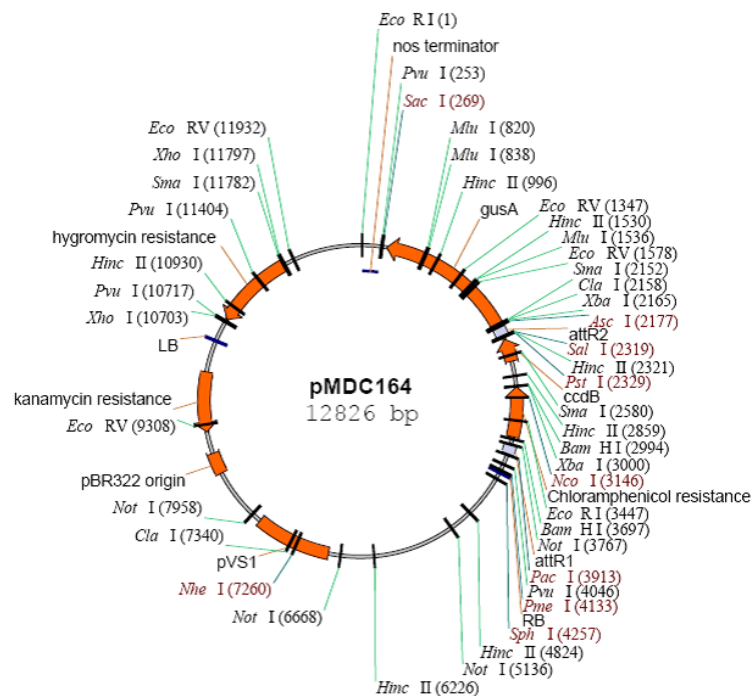
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

7.5 Vektorkarten

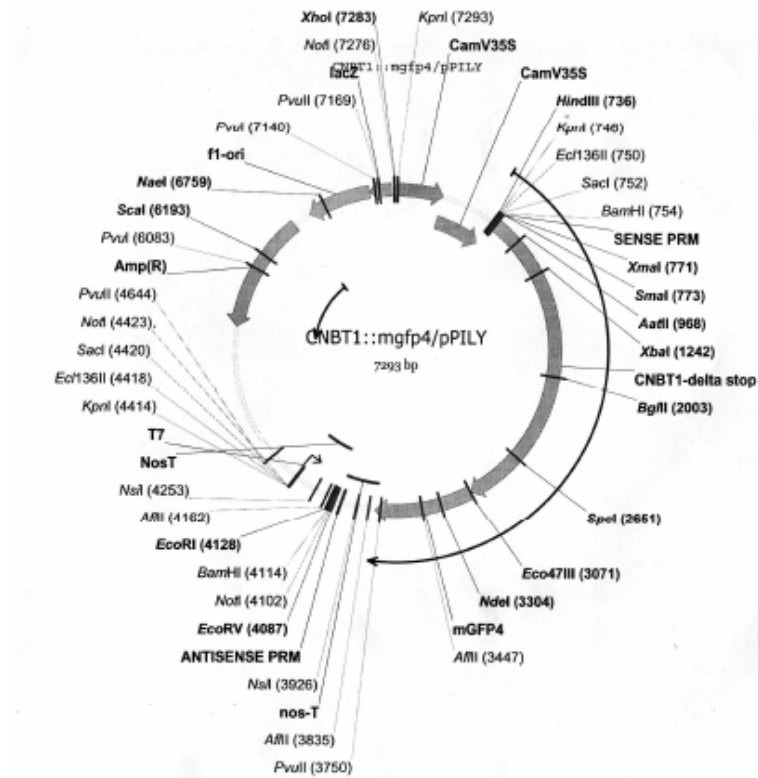
7.5.1 pDONR Zeo: Entry Vektor für Gateway-Klonierung (Invitrogen)



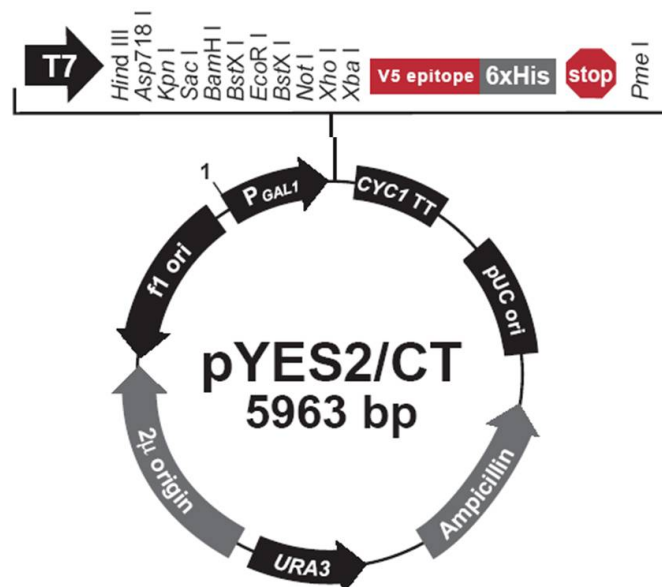
7.5.2 pMDC164: Vektor für die AtNIP1;1/Promotor-Fusion (Curtis et al., 2003)



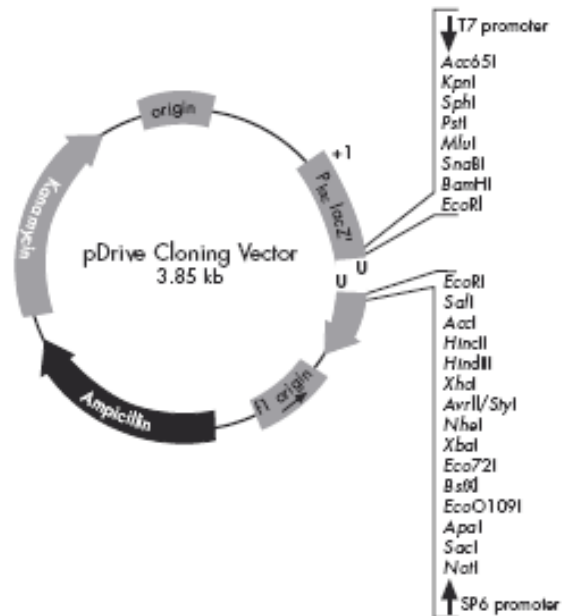
7.5.3 pPily: Vektor für die transiente Transformation der AtNIP1;1/mGFP4-Fusion in Zwiebelzellen



7.5.4 pYES2/CT: Hefeexpressionsvektor (Invitrogen)



7.5.5 pDRIVE: TA-Klonierungsvektor (QIAGEN)



Publikationen

Uehlein, N., Fileschi, K., Eckert, M., Bienert, G.P., Bertl, A., Kaldenhoff, R. (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry* 68 (1), 122-129

Präsentationen

"Molecular Basics of Mycorrhizal Symbioses": 6. Kolloquium im Rahmen des Schwerpunktprogramms "Molekulare Grundlagen der Mykorrhiza-Symbiosen", 2005.
Role of aquaporins in arbuscular mycorrhiza

Lebenslauf

Zur Person

Name	Kerstin Fileschi
Geburtsdatum	13.03.1979
Geburtsort	Braunschweig
Familienstand	ledig

Schulische und berufliche Ausbildung

1985 – 1989	Grundschule Klint in Braunschweig
1989 – 1998	Wilhelm – Bracke – Gesamtschule in Braunschweig
1998 – 2004	Gartenbau – Studium (Diplom) an der Universität Hannover Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur Biologie der Kreuzdornblattlaus <i>Aphis nasturtii</i> (Kalt.) (Homoptera: Aphididae)
2005 – 2008	Promotionsstudium an der TU Darmstadt in der Arbeitsgruppe für Angewandte Pflanzenwissenschaften bei Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Darmstadt, 25. März 2008

.....